

Strukturelle Charakterisierung von  
pGolemi, einem hochaffinen,  
synthetischen Mena EVH1-Liganden

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs Biologie und Geografie  
an der Universität Duisburg-Essen  
Campus Essen

vorgelegt von

Nina Malaika Link  
geboren in Buchen (Odenwald)

Januar 2009

Die der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegenden Experimente wurden in der Abteilung Strukturelle und Medizinische Biochemie am Zentrum für Medizinische Biotechnologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bayer
2. Gutachter: Prof. Dr. Hoffmann
3. Gutachter: Prof. Dr. Siebers

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Hensel

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Mai 2009

---

Die zwei größten Tyrannen der Erde:  
der Zufall und die Zeit.

Johann Gottfried Herder

---

---

# INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	X
I. Einleitung .....	1
1. Prolinreiche Sequenzmotive als Adaptersequenzen .....	1
2. EVH1-Domänen - prolinbindende Domänen im Cytoskelett.....	3
2.1 Vorkommen der EVH1-Domäne .....	3
2.2 Strukturelle Charakteristika .....	4
3. Die Ena/VASP-Familie .....	6
4. <i>Listeria monocytogenes</i> - ein Modellsystem für die Aktin-Polymerisierung.....	8
4.1 Infektionszyklus des Pathogens .....	8
4.2 Rolle des ActA-Proteins .....	10
4.3 Ena/VASP-Proteine im Zuge der Aktin-Polymerisierung .....	11
5. Erstellung von Mimetika für das EVH1:ActA-System.....	13
5.1 Das Miniaturprotein pGolemi .....	13
5.2 Das Domänenmimetikum P11 .....	14
II. Zielsetzung .....	16
III. Materialien und Methoden .....	18
1. Chemikalien und Geräte.....	18
1.1 Chemikalien .....	18
1.2 Geräte.....	18
1.3 Rechner und Software .....	19
2. Peptidsynthese.....	19
2.1 Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Peptide .....	19
2.2 Synthese von pGolemi .....	20
2.3 Synthese von P11 .....	21
3. NMR-Spektroskopie.....	22
3.1 Probenvorbereitung.....	22
3.2 Gefriertrocknung der Peptide .....	23
3.3 Geräte und Messbedingungen .....	23
3.4 Prozessierung der Spektren .....	25
3.5 Auswertung der Spektren .....	25

---

---

4. Strukturaufklärung.....	28
4.1. Das Xplor-NIH-Kraftfeld .....	29
4.2 Erstellen der Koordinatendateien .....	30
4.3 <i>Simulated-Annealing</i> -Läufe .....	31
4.4 Verfeinerung der Struktur.....	32
4.5 Analyse des Ensembles .....	33
5. Homologiemodellierung mit Hilfe des Programmpaketes YASARA TwinSet.....	34
5.1. Erstellen einer Startstruktur für die Strukturberechnung von P11 .....	34
5.2 Komparative Molekülmodellierung für P11, pGolemi und Mena EVH1 .....	35
5.3 Analyse der Trajektorien und Strukturmodelle .....	36
 IV. Ergebnisse und Diskussion.....	 37
1. Strukturbestimmung von pGolemi .....	37
1.1 Aufnahme und Zuordnung der Spektren für pGolemi .....	37
1.2 Analyse der Sekundärstruktur nach Wishart .....	40
1.3 Identifizierung von Wasserstoffbrückenbindungen .....	41
1.4 Vorhersage der dihedralen Winkel mit Hilfe von TALOS.....	41
1.5. Berechnung der Tertiärstruktur mit Xplor-NIH .....	42
1.6. Charakterisierung der erhaltenen Strukturenschar .....	46
2. Analyse der pGolemi:P11-Wechselwirkungen mittels NMR.....	55
2.1 Vorläufige Zuordnung der erhaltenen P11-Spektren .....	55
2.2 Analyse der Komplexspektren aus pGolemi und P11 .....	58
3. Erstellung von Homologiemodellen für pGolemi, Mena EVH1 und P11.....	60
3.1 Auswahl der Basisstruktur und der Sequenzen.....	61
3.2 Analyse der EVH1-Komplexe .....	62
3.3 Das strukturierte Modell von P11 zeigt konformationelle Beschränkungen des ersten Faltblattes.....	66
3.4 Informationen aus dem P11:pGolemi-Komplex.....	69
4. Biologische und mechanistische Implikationen.....	72
4.1 Die bindungsvermittelnden Reste in pGolemi gruppieren sich in zwei Kategorien .....	72
4.2 Die Mena-spezifische Bindung ist eine Konsequenz der stark eingeschränkten Konformation von pGolemi.....	76
4.3 Die Homologiemodellierung der EVH1-Komplexe deckt zwei ε-Determinanten von EVH1-Domänen auf .....	79
4.4 Durch Erstellung eines Strukturmodells des pGolemi:P11-Komplexes zeigen sich Optimierungspunkte für P11 .....	82
4.5 pGolemi kann zur Aufklärung der Aktinrekrutierung von <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> und der Initiation der Aktinpolymerisierung beitragen.....	84
 V. Zusammenfassung.....	 88
 Literaturverzeichnis .....	 90

---

---

VI. Anhang.....	102
1. Chemische Verschiebungen und Abstandsbeschränkungen für die Strukturberechnung von pGolemi .....	102
2. Vorläufige chemische Verschiebungen von P11 .....	110
3. XPLOR-Protokolle .....	111
4. C $\alpha$ -Traces und Distanzplots der einzelnen Modelle .....	119
4.1 EVH1:pGolemi .....	120
4.2 EVH1:PRII .....	121
4.3 P11 .....	122
4.4 P11:pGolemi .....	123
5. Kontaktprofil der Homologiemodelle im Vergleich zu experimentellen Daten ...	124

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl-Gruppe
ActA	<i>actin nucleator protein A</i> , <i>actin assembly-inducing protein A</i>
Ahx	ε-Aminohexansäure
aPP	<i>avian pancreatic peptide</i>
Äq.	Äquivalente
C <sub>am</sub>	amidiertes Cystein
CD	Circulardichroismus (Spektroskopie)
CG	<i>conjugate gradient</i>
COSY	<i>correlated spectroscopy</i> , Korrelationsspektroskopie
CSI	<i>chemical shift index</i>
DCM	Dichlormethan
DIC	N,N-Diisopylcarbodiimid
DMF	N,N-Dimethylformamid
DQF-COSY	<i>double-quantum filtered correlation spectroscopy</i>
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat
E <sub>cyc</sub>	zyklisches Glutamat
Ena	<i>Enabled</i>
ESI	<i>electron spray ionisation</i>
EVH1	Ena/VASP Homologie-Domäne 1
Evl	<i>Ena/ VASP-like protein</i>
FID	<i>free induction decay</i>
FMOc	9H-Fluoren-9yl-methoxycarbonyl
fs	Femtosekunde
FT	Fourier-Transformation
Gl.	Gleichung
HOBt	1-Hydroxy-1H-Benzotriazol
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
InlA/B	Internalin A bzw. B
K	Kelvin
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
LLO	Lysteriolysin (Hämolysin der Listerien)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
MC	Monte Carlo-Simulation
Mena	<i>Mammalian Enabled</i>

MHz	Megahertz
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i> bzw. Kreuzresonanz im NOESY-Spektrum
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
ns	Nanosekunde
o. g.	oben genannt
PLC	Phospholipase
PMF	<i>potential of mean force</i> , effektives Potential
PP	pankreatisches Peptid
PPII	Polyprolin-Helix Typ II
ppm	<i>parts per million</i>
PR	prolinreiches Motiv in ActA
ps	Picosekunden
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidin- phosphonium-hexafluorophosphat
RMSD	root mean square deviation
s. o.	siehe oben
SA	<i>simulated annealing</i>
SD	<i>steepest descent</i>
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TPPI	<i>time proportional phase incrementation</i>
UV	Ultravioletter Spektralbereich
VASP	<i>Vasodilator-stimulated Phosphoprotein</i>
VdW	van der Waals-Kräfte
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
$\delta$	chemische Verschiebung
$\varphi$	Phi-Dieder-Winkel (C-N-C $_{\alpha}$ -C) für das Peptidrückgrat
$\chi_1$	Chi <sub>1</sub> -Dieder-Winkel (N-C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ -X) für die Seitenkette
$\psi$	Psi-Dieder-Winkel (N-C $_{\alpha}$ -C-N) für das Peptidrückgrat
$\omega$	Omega-Dieder-Winkel (H-N-C-O) für die Peptidbindung

Fachausdrücke aus dem englischen Sprachgebrauch, die mangels deutschen Äquivalents nicht übersetzt werden konnten, sind kursiv gedruckt.

Die Aminosäurenomenklatur erfolgte nach den Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für Biochemische Nomenklatur (Eur. J. Biochem. 1984, 138:9-37); Motive für Peptidliganden sind nach Aasland et al. (2002) bezeichnet.



## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. I. 1: Darstellung einer idealen Polyprolinhelix Typ II (PPII) .....	2
Abb. I. 2: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von EVH1-Domänen am Beispiel der Mena EVH1-Domäne (PDB-Eintrag 1evh).....	4
Abb. I. 3: Sequenzvergleich ausgewählter Klasse I-EVH1-Domänen .....	5
Abb. I. 4: Schematische Darstellung des Infektionszyklus von <i>Listeria monocytogenes</i> .....	9
Abb. I. 5: Schema der Aktinnukleation am Raketenschweif .....	12
Abb. I. 6: Sequenzvergleich zwischen aPP, den PR-Motiven von ActA und pGolemi .....	13
Abb. I. 7: Bänderdarstellung der Mena EVH1-Domäne.....	14
 Abb. III. 1: Primärstruktur von P11.....	20
Abb. III. 2: Schema der theoretisch für einen Alaninrest zu erwartenden Resonanz- Signale mit angedeutetem <i>Chain Tracing</i> .....	26
 Abb. IV. 1: 1D- <sup>1</sup> H-Spektrum von pGolemi.....	38
Abb. IV. 2: „ <i>Fingerprint</i> -Region“ aus dem NOESY-Spektrum für pGolemi .....	39
Abb. IV. 3: Graphische Darstellung der Sekundärstrukturanalyse nach Wishart .....	40
Abb. IV. 4: Energieprofil der erhaltenen Strukturenscharen bei Verwendung unterschiedlicher Protokolle. ....	43
Abb. IV. 5: Randbedingungen und Ergebnis der Strukturberechnung.....	47
Abb. IV. 6: Struktureller Vergleich von aPP und pGolemi.....	48
Abb. IV. 7: Aminoterminaler Teil von pGolemi.....	50
Abb. IV. 8: Ramachandran-Darstellung der Torsionswinkel.....	51
Abb. IV. 9: Darstellung der Ligandenbindungsregion der Mena EVH1-Domäne.....	54
Abb. IV. 10: Überlagerung eines NOESY- und TOCSY-Spektrums im H <sub>N</sub> -H <sub>α</sub> /methyl- Bereich von P11.....	56
Abb. IV. 11: Vergleich von 1D- <sup>1</sup> H-Spektren des P11-Peptids im Lauf der Zeit.....	57
Abb. IV. 12: Überlagerung der 1D- <sup>1</sup> H-Spektren von pGolemi, P11 und dem Komplex aus beiden.....	58
Abb. IV. 13: Homologiemodelle der Mena EVH1-Domäne in Komplex mit pGolemi und PRII.....	63
Abb. IV. 14: Darstellung des strukturierten Modells von P11.....	67
Abb. IV. 15: Homologiemodell von P11 im Komplex mit pGolemi .....	70
Abb. IV. 16: Darstellung der Effekte von einzelnen Alaninmutationen auf die Affinität von pGolemi zu Mena.....	76
Abb. IV. 17: Darstellung der Effekte von Alaninmutationen im hydrophoben Kern auf die Affinität von pGolemi zu den einzelnen Ena/VASP-Mitgliedern.....	78
Abb. IV. 18: Darstellung der Effekte von Alaninmutationen im prolinreichen Teil auf die Affinität von pGolemi zu den einzelnen Ena/VASP-Mitgliedern.....	80

# TABELLENVERZEICHNIS

Tab III. 1: Aminosäuresequenz der in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Peptide .....	20
Tab III. 2: Zusammenstellung der für die einzelnen Proben durchgeführten NMR-Experimente .....	24
Tab. IV. 1: Zusammenfassung der wichtigsten Parameter für die Strukturberechnung von pGolemi. ....	45
Tab. IV. 2: Zusammenstellung der Torsionswinkel der PP-Regionen aus pGolemi und den beiden Substraten in den Komplexstrukturen von EVH1-Domänen und aPP. ....	52

---

# I. EINLEITUNG

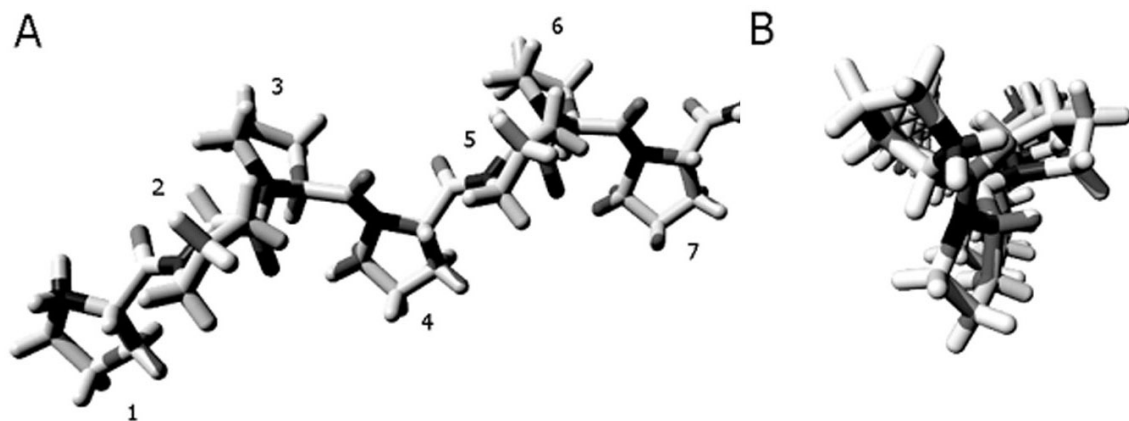
Die große Komplexität der Signalwege in der Zelle kann nur über eine zeitlich und räumlich streng geregelte Abfolge von Proteinwechselwirkungen aufrecht erhalten werden. Für die korrekte Lokalisierung der Reaktionspartner sind spezialisierte Domänen verantwortlich, welche jeweils hoch spezifische Substratpräferenzen haben (Pawson und Nash, 2003). Neben Motiven mit posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierungen, die von PTB- und SH2-Domänen erkannt werden (Yaffe, 2002) sind oft bestimmte Aminosäuremotive Substrat dieser Interaktionsmodule.

## 1. Prolinreiche Sequenzmotive als Adaptersequenzen

Sequenzen mit überdurchschnittlichem Prolingehalt dienen häufig als ein solches Erkennungsmotiv. Prolinreiche Abschnitte sind in einer Vielzahl von Proteinen enthalten; in *Caenorhabditis elegans* sind sie das zweithäufigste, in *Drosophila melanogaster* sogar das häufigste vorkommende Sequenzmotiv (Rubin *et al.*, 2000). Die Bedeutung der prolinreichen Motive wurde jedoch erst durch die Entdeckung der immer größer werdenden Zahl von polyprolinbindenden Domänen wie SH3-, WW-, GYF-, UEV- und EVH1-Domänen offenkundig, welche vielfach Teil von Signaltransduktionsproteinen sind, (Mayer, 2001; Ilsley *et al.*, 2002; Kofler und Freund, 2006; Pornillos *et al.*, 2002, Ball *et al.*, 2002).

Wegen der besonderen Eigenschaften des Prolins, welches als einzige proteinogene Iminosäure eine sekundäre Aminogruppe besitzt, sind prolinreiche Sequenzmotive in Lösung meist in einer besonderen, helikalen Konformation angeordnet, einer Polyprolin-Helix. Während in hydrophoben Lösungsmitteln ein anderer Typ dieser Anordnung, eine rechtsgängige Polyprolin-Helix Typ I, gefunden werden konnte, wurde in wässriger Lösung nur die Polyprolin-Helix Typ II (PPII-Helix) nachgewiesen (Cowan und McGavin, 1955, Adzhubei und Sternberg, 1993). Diese Sekundärstruktur wird durch die linksgängige Windung von *all-trans*-Aminosäuren mit einer Steighöhe von 9,3 Å entsprechend 3 Resten charakterisiert, was eine sehr gestreckte Form der Peptidkette mit

Diederwinkeln von etwa  $\psi=-78^\circ$  und  $\varphi=145^\circ$  zur Folge hat (Cowan und McGavin, 1955, Cubellis *et al.*, 2005). Die Ausbildung dieser Sekundärstruktur wird durch den sehr eingeschränkten Ramachandran-Raum von Prolinresten und deren starrer Pyrrolidinseitenkette begünstigt. Die PPII-Helix verhindert durch ihre gestreckte Anordnung intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Prolinresten; die Carbonyl- und Amidgruppen des Rückgrats stellen jedoch ideale Wasserstoffbrückenakzeptoren für intermolekulare Wechselwirkungen mit weiteren Proteinen oder dem Lösungsmittel dar (Abb. I.1.A).



**Abb. I.1:** Darstellung einer idealen Polyprolinhelix Typ II (PPII). **A)** Seitenansicht auf ein Heptamer. **B)** Sicht auf den Aminoterminus entlang der Helixachse.

Ideale PPII-Helices weisen eine dreifache Rotationssymmetrieachse ( $C_3$ ) auf: eine Windung enthält genau drei Reste (Abb. I.1.A), so dass die Reste  $i$  und  $i+3$  die gleiche Orientierung relativ zur Achse besitzen und die einzelnen Seitenketten jeweils die Ecken eines dreiseitigen Prismas auskleiden. Diese ausgestreckte Anordnung verleiht PPII-Abschnitten eine keilförmige Gestalt (Abb. I.1.B).

Für die Ausbildung einer PPII-Helix muss die Sequenz nicht komplett aus Prolinen bestehen. Auch andere Aminosäuretypen wie Polyglutamin, Polyalanin oder auch Gemische aus Prolin und anderen Resten können in einer solche Konformation vorliegen (Shi *et al.*, 2002; Adzhubei und Sternberg, 1993). Die Abfolge der Aminosäuren ist hier jedoch kritisch, da ein Rest an der falschen Position die gesamte Geometrie auflösen kann (Creamer, 1998). Es gibt vermehrt Hinweise darauf, dass viele bisher irrtümlich als

ungeordnet angesehene Sequenzbereiche (*random coil*) ebenso in einer Polyprolinhelix Typ II (PPII) vorliegen (Rath *et al.*, 2005, Cubellis *et al.*, 2005). Insgesamt weisen ca. 2 % der Reste in globulären Proteinen eine PPII-Konformation auf (Stapley und Creamer, 1999, Williamson, 1994). Wegen der starren und regelmäßigen Anordnung der Aminosäurereste ist diese Sekundärstruktur ideal als Signalsequenz geeignet.

Prolinbindende Domänen erkennen PPII-Motive meist durch Wechselwirkungen der hydrophoben Seitenketten des Prolins mit konservierten, aromatischen Resten auf der Domäne (Williamson, 1994). Hierbei verhindert die pseudo-C<sub>2</sub>-Symmetrie der PPII-Sekundärstruktur senkrecht zur C<sub>3</sub>-Symmetrieachse ein bestimmtes Register der Bindung; das heißt, die Liganden können in beiden Orientierungen gebunden werden, da Rückgrat und Seitenketten beide Male die gleiche Position einnehmen (Ball *et al.*, 2005). Zur Erhöhung der Spezifität werden daher im Liganden häufig noch weitere, flankierende Bindungs determinanten für eine affine Bindung an die jeweilige Domäne benötigt, wie etwa ein basischer Rest für SH3-Domänen (Zarrinpar *et al.*, 2003, Kay *et al.*, 2000) oder ein hydrophober Rest für EVH1-Domänen (Niebuhr *et al.*, 1997).

## 2. EVH1-Domänen - prolinbindende Domänen im Cytoskelett

Ein kürzlich entdeckte Art von polyprolinbindenden Domänen ist die 112 - 114 Aminosäuren umfassende Ena/VASP-Homologie 1 (EVH1)-Domäne (Gertler *et al.*, 1996).

### 2.1 Vorkommen der EVH1-Domäne

EVH1-Domänen kommen hauptsächlich in Regulatoren der Dynamik des Aktinskeletts vor. Hierzu gehört die Familie der Homer-Proteine, welche neuronale Prozesse wie Suchtverhalten und Verhaltensbildung steuern und in der postsynaptischen Dichte, einer aktinreichen Struktur in dendritischen Dornen, lokalisiert ist (Shiraishi-Yamaguchi und Furuichi, 2007). Auch Wiskott-Aldrich-Syndrom-(WASP)-Proteine beinhalten eine EVH1-Domäne. Diese Proteine veranlassen unter Anderem die Aktinpolymerisierung in Filopodien (Zigmond, 2000). Die dritte Proteinfamilie mit EVH1-Domänen sind die Sprouty-verwandten (SPRED) Proteine. Die Aufgaben dieser neu entdeckten Proteine

sind noch nicht ganz entschlüsselt; es wurden jedoch bereits die Hemmung von Zellmotilität sowie die Regulation der Blut- und Knochenbildung über Ras/ERK-Signalwege in der Maus nachgewiesen (Bundschu *et al.*, 2007). Schließlich besitzen auch die namensgebenden *Enabled/Vasodilator-stimulated Phosphoprotein* (Ena/VASP)-Proteine eine EVH1-Domäne. Diese Proteine sind an Ausstülpungen in den Lamellipodien und Filopodien und somit an der Zellwanderung sowie der Leitung und Zielführung der Axone beteiligt (Krause *et al.*, 2003).

## 2.2 Strukturelle Charakteristika

EVH1-Domänen sind strukturell stark konserviert (Ball *et al.*, 2000; Fedorov *et al.*, 1999; Gertler *et al.*, 1996; Prehoda *et al.*, 1999). Ihre Sekundärstruktur besteht aus einer zum



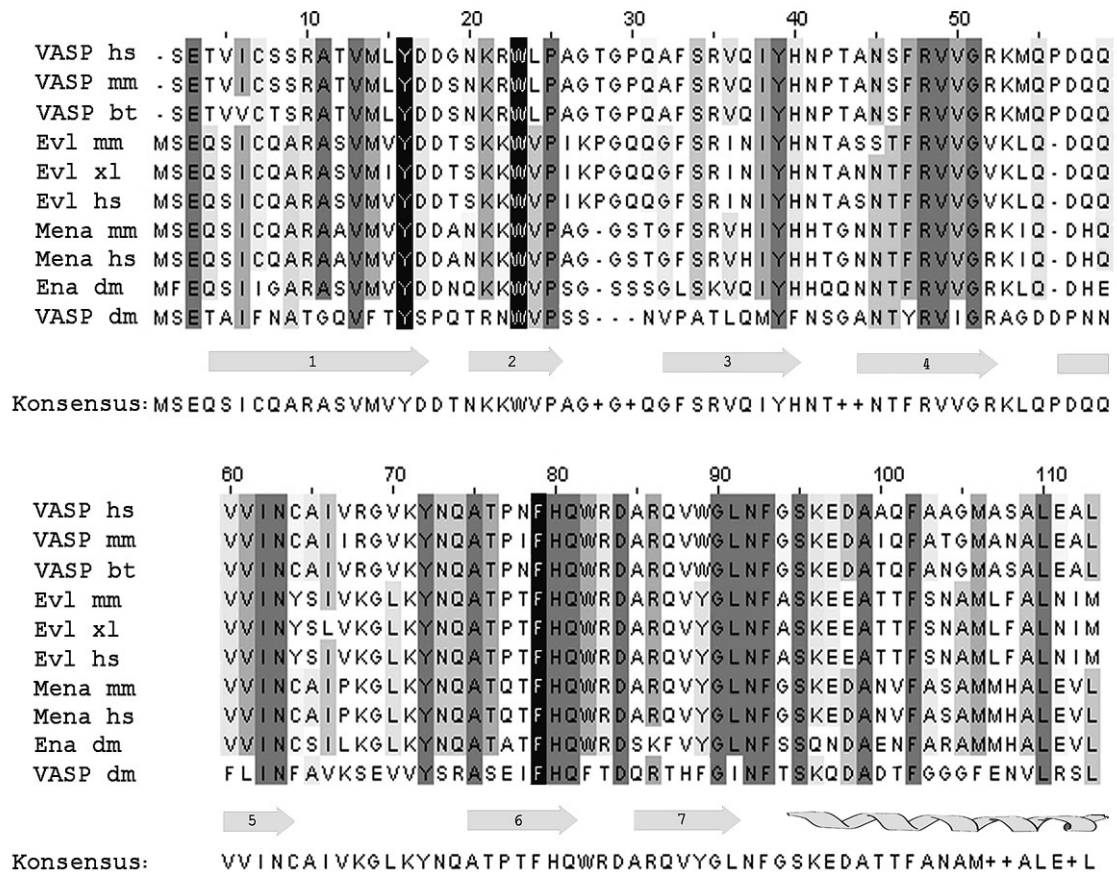
**Abb. I.2:** Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von EVH1-Domänen am Beispiel der Mena EVH1-Domäne (PDB-Eintrag 1evh). Die  $\beta$ -Stränge sind sequentiell durchnummeriert.

Teil geöffneten, siebensträngigen  $\beta$ -Tonne, die durch eine lange carboxyterminale Helix vervollständigt wird (Abb. I.2). Obwohl die Sequenzen jener Domänen stark divergieren, ist diese Faltung auch in PH-, PTB-, und FERM-Domänen zu finden und scheint ein bewährtes Gerüst für Proteininteraktionsdomänen darzustellen (Saraste und Hyvönen, 1995; Pearson *et al.*, 2000). Die Bindung der prolinreichen Substrate erfolgt bei den EVH1-Domänen in einer schmalen Furche parallel zur  $\alpha$ -Helix, die von drei

hochkonservierten aromatischen Resten – der aromatischen Triade – ausgekleidet ist.

Die sequentiellen und auch strukturellen Differenzen der Vertreter untereinander spiegeln sich in unterschiedlichen Substratpräferenzen wider: während Klasse I-Domänen (D/E)FPx $\Phi$ P-Motive binden (Ball *et al.*, 2000; Niebuhr *et al.*, 1997), liegt die Spezifität der Klasse II auf Motiven der Sequenz PPxx(F/Y) (Tu *et al.*, 1998; Naisbitt *et al.*, 1999). Zur Klasse II gehören die Homer-Proteine und vermutlich auch die SPRED-Proteine, die Klasse I der EVH1-Domänen umfasst die Ena/VASP-Proteine (Ball *et al.*, 2002).

Trotz der Sequenzähnlichkeit zu den Ena/VASP-Proteinen werden WASP-Proteine zu einer weiteren Klasse III zugeordnet, da sie lange Aminosäuresequenzen von über 25 Resten erkennen (Ball *et al.*, 2002; Volkman *et al.*, 2002).



**Abb. I.3:** Sequenzvergleich ausgewählter Klasse I-EVH1-Domänen. Identische Reste sind nach Grad der Konservierung schattiert. Die hydrophobe Triade ist schwarz hinterlegt, Sekundärstrukturelemente sind über der Konsensussequenz der Domänen eingezeichnet. Abkürzungen: bt *Bos taurus*, dm *Drosophila melanogaster*, hs *Homo sapiens*, mm *Mus musculus*, xl *Xenopus laevis*. Erstellt mit T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000).

In Abb. I.3 sind die zueinander homologen Sequenzen der EVH1-Domänen aus Ena/VASP-Proteinen abgebildet. Die hohe Konservierung der Domänensequenzen führt zu einer Sequenzidentität von bis zu 73 % innerhalb der Familie, während die Identität zu WASP EVH1-Domänen bei durchschnittlich 22 % liegt (Gertler *et al.*, 1996). Vor Allem die Reste in der Ligandenbindungsstelle zwischen den Faltblattsträngen  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_6$  weisen bei Klasse I-Domänen eine hohe Konservierung auf. Die aromatische Triade, welche direkt an der Ligandenbindung beteiligt ist, ist in Abb. I.3 schwarz hinterlegt

(Tyr16, Trp23 und F79 in VASP-Nomenklatur). Diese Reste sind in der Domäne senkrecht zueinander angeordnet und binden den Liganden in einer PPII-Konformation über hydrophobe Kontakte zu den Seitenketten der Proline. In den gut untersuchten Klasse I-Domänen stabilisiert eine einzige Wasserstoffbrückenbindung ausgehend vom Indol-NH des Trp23 zum Carbonylsauerstoff des zweiten Prolins (FPPPP) die Bindung des Kernmotivs (Prehoda *et al.*, 1999; Fedorov *et al.*, 1999). Die Interaktion mit dem Liganden sowie deren Register wird jedoch substantiell durch den aminoterminalen aromatischen Rest bestimmt (FPPPP); ohne diese zusätzliche Bindungsdeterminante besitzen die Motive nur noch eine vernachlässigbare Affinität zu EVH1-Domänen (Niebuhr *et al.*, 1997; Ball *et al.*, 2000).

Wie auch andere prolinbindende Domänen interagieren EVH1-Domänen zwar spezifisch mit ihren Substraten, jedoch mit nur mittlerer mikromolarer Affinität (Ball *et al.*, 2000; Niebuhr *et al.*, 1997). In Anbetracht der Gerüstfunktion dieser Domänen in hochdynamischen Signalsystemen wird die niedrige Affinität verständlich. Zur Vermeidung von Dysregulation muss nach Weiterleitung des Signals die Wechselwirkung der Interaktionspartner wieder aufgelöst werden, was bei nur mittleren Dissoziationskonstanten für den Liganden deutlich erleichtert wird (Kay *et al.*, 2000; Renfranz und Beckerle, 2002). So wirkt zum Beispiel ein Mitglied der Ena/VASP-Familie, *Enabled* (Ena), als Effektor der Abl-Tyrosinkinase an der Signaltransduktion während der Entwicklung des Gehirns mit (Gertler *et al.*, 1990; Wills *et al.*, 1999).

### 3. Die Ena/VASP-Familie

Zu den Mitgliedern der Ena/VASP-Proteine gehören neben *Enabled* (Ena) aus *Drosophila melanogaster* auch *Mammalian Enabled* (Mena), das *vasodilator-stimulated phosphoprotein* (VASP) und *Ena/VASP-like* (Evl). Die drei in Säugetieren exprimierten Vertreter, Mena, VASP und Evl, sind vor Allem in Zellabschnitten mit erheblichem Umbau des Aktinskeletts angereichert - wie in fokalen Adhäsionen, in Stressfasern und Lamellipodien (Gertler *et al.*, 1996; Reinhard *et al.*, 1992). So wird diese Proteinfamilie unter



Anderem für T-Zell-Aktivierung, Phagocytose, Gestaltbildung des Epithels sowie die Wanderung von Neutrophilen, Fibroblasten und Neuronen benötigt (Krause *et al.*, 2003). Alle Mitglieder besitzen die gleiche Domänenaufteilung: eine stark konservierte EVH1-Domäne am Aminoterminal, einen polyprolinreichen Abschnitt und eine carboxyterminale EVH2-Domäne. EVH2-Domänen, welche keinerlei Verwandtschaft zu EVH1-Domänen besitzen, sorgen für die Bindung an freie, globuläre Aktine (G-Aktin) und Aktinfasern (F-Aktin) sowie die Oligomerisierung der Ena/VASP-Proteine (Bachmann *et al.*, 1999; Laurent *et al.*, 1999; Walders-Harbeck *et al.*, 2002; Zimmermann *et al.*, 2002). Die prolinreiche Region vermittelt jeweils den "Crosstalk" zu anderen Signalwegen über Interaktionen mit den Tyrosinkinasen Abl und Src, IRSp53 und FE65 (Ahern-Djamali *et al.*, 1998; Huttelmaier *et al.*, 1999; Gertler *et al.*, 1995; Krugmann *et al.*, 2001; Ermekova *et al.*, 1997). Hier findet auch die Ena/VASP-Proteine funktionell unabdingbare Interaktion zu Profilin statt (Ahern-Djamali *et al.*, 1999). Die Aufgabe dieser Proteinfamilie - die Beeinflussung der Aktengeometrie (Barzik *et al.*, 2005; Huttelmaier *et al.*, 1999) - kann jedoch nur erfüllt werden, wenn diese korrekt am Leitsaum, also dem aktiv propagierenden Teil der Zellmembran, lokalisiert sind (Bear *et al.*, 2002; Rottner *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1996). Hierfür ist ausschließlich die aminoternale EVH1-Domäne verantwortlich, welche mit einer Reihe von Skelettproteinen wie Zyxin, Vinculin, Lamellipodin, Migfilin und Palladin interagiert (Reinhard *et al.*, 1995, Brindle *et al.*, 1996; Reinhard *et al.*, 1996, Krause *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2006, Boukhelifa *et al.*, 2004). Erst kürzlich wurde die Struktur eines ternären Komplexes aus VASP, Profilin und F-Aktin gelöst, der molekulare Details der Interaktion mit Profilin zeigt (Ferron *et al.*, 2007). Ein Hauptteil der Erkenntnisse über die Aufgaben dieser für die Aktinpolymerisierung wichtigen Proteinfamilie konnten jedoch über Studien im Modellsystem *Listeria monocytogenes* gewonnen werden.

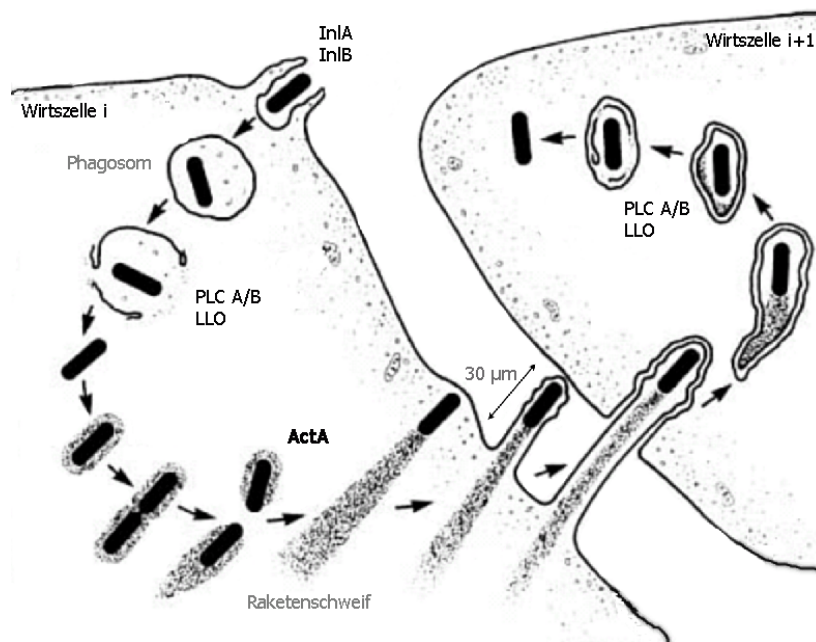
## 4. *Listeria monocytogenes* - ein Modellsystem für die Aktin-Polymerisierung

Wie viele *Shigella*- und *Rickettsia*-Spezies kann sich auch das Bakterium *Listeria monocytogenes* durch die Ausbeutung des Wirts-Aktinskeletts in der Zelle bewegen (Gruenheid und Finlay, 2003). Das grampositive, fakultativ anaerobe, intrazelluläre Pathogen wird oft durch verdorbene Nahrung übertragen. Während infizierte, gesunde Individuen gewöhnlich nur an Gastroenteritis leiden, sind vor Allem Schwangere, Ältere und Menschen mit geschwächtem Immunsystem von schweren Komplikationen wie Bindehautentzündung, Osteomyelitis, Endocarditis, Meningitis, Placentitis und Fehlgeburten betroffen (Gray und Killinger, 1966). Diese Infektionskrankheiten tragen zu einer Letalität von 30 % bei; der zweithöchsten bei Nahrungsmittelkeimen nach *Vibrio vulnificus* (Mead *et al.*, 1999; Hof *et al.*, 1997). Durch die intrazelluläre Vermehrung des Erregers konnten bisher jedoch keine einsetzbaren Impfstoffe für den Menschen entwickelt werden, insbesondere da über diesen Verbreitungsweg viele Komponenten der zellulären Immunabwehr unterlaufen werden (Joseph und Goebel, 2007).

### 4.1 Infektionszyklus des Pathogens

99 % der verzeichneten Listerien-Infektionen gehen auf die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln zurück (Mead *et al.*, 1999). Im Darm angekommen, adhären die Bakterien an den dortigen Epithelzellen und werden über Phagozytose resorbiert. Ein Schema des Infektionsweges von *Listeria monocytogenes* ist in Abb. I.4 dargestellt. Verantwortlich für die Aufnahme in die Zelle sind die beiden Oberflächenproteine Internalin A und B (Inl A/B), welche an Cadherin bzw. an die Met-Rezeptortyrosinkinase, den Rezeptor für den Hepatozyten-Wachstumsfaktor, binden (Gaillard *et al.*, 1991, Shen *et al.*, 2000). Nach der Internalisierung sind die Bakterien von einer Vakuole umgeben, die durch Fusion mit Lysosomen einen sauren pH erhält. Die saure Umgebung stimuliert die Expression des bakteriellen Listeriolysins, einem dem Hämolysin aus Staphylococcen verwandten cholesterin-abhängigen Cytolysin, das die Vakuole durch Porenbildung beschädigt (Gaillard *et al.*, 1987; Beauregard *et al.*, 1997). Zusätzlich werden in dieser Infektionsphase auch zwei spezifische, listerielle Phospholipasen, PLC A und B,

exprimiert, welche die Membran komplett lysieren (Sheehan *et al.*, 1994). Nach der kompletten Auflösung der Vakuole liegen die Erreger frei im Cytosol der Wirtszelle vor. Anschließend vermehren sich die Bakterien durch Teilung und beginnen, an der Zellwand eine diffuse Aktinwolke zu bilden (Gaillard *et al.*, 1987). Diese diffusen kurzen Aktinfilamente polarisieren sich nach ca. zwei Stunden, um den typischen Raketenschweif auszubilden, der für die hohe Geschwindigkeit innerhalb der Zelle sorgt (etwa 20  $\mu\text{m}/\text{min}$ ; Dabiri *et al.*, 1990; Theriot *et al.*, 1992).



**Abb. I.4:** Schematische Darstellung des Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes*. Wichtige bakterielle Proteine für die einzelnen Phasen sind eingezeichnet. InlA/B: Internalin A/B, PLCs: Phospholipasen A/B, LLO: Lysteriolysin, ActA: Actin-assembly inducing protein A. Verändert nach Portnoy *et al.*, 2002.

Mit Hilfe dieses Schweifs können sich Listerien schnell innerhalb der Zelle und an die Zellwand bewegen. Nach Erreichen der Zellwand bilden sich pseudopodienartige Ausstülpungen, die bis zu 30  $\mu\text{m}$  lang werden können (Dabiri *et al.*, 1990; Tilney und Portnoy, 1989). Diese Ausstülpungen werden dann von einer weiteren Zelle endozytiert und der Zyklus beginnt von Neuem. Nach der Infektion der Epithelzellen des Darms erreicht das Pathogen so zunächst die *Lamina propria*, um von dort aus über die Lymphknoten in den Blutstrom zu gelangen. Nach diesem Übertritt sind sekundäre

Infektionsziele Leber, Milz sowie Gehirn und Plazenta, wo schwere Entzündungen ausgelöst werden (Lecuit, 2007).

Die Proteine des Aktinschweifs sind denen im Lamellipodium sehr ähnlich, daher kann das Bakterium als vereinfachtes Modell für die Vorgänge am Leitsaum angesehen werden (Auerbuch *et al.*, 2003).

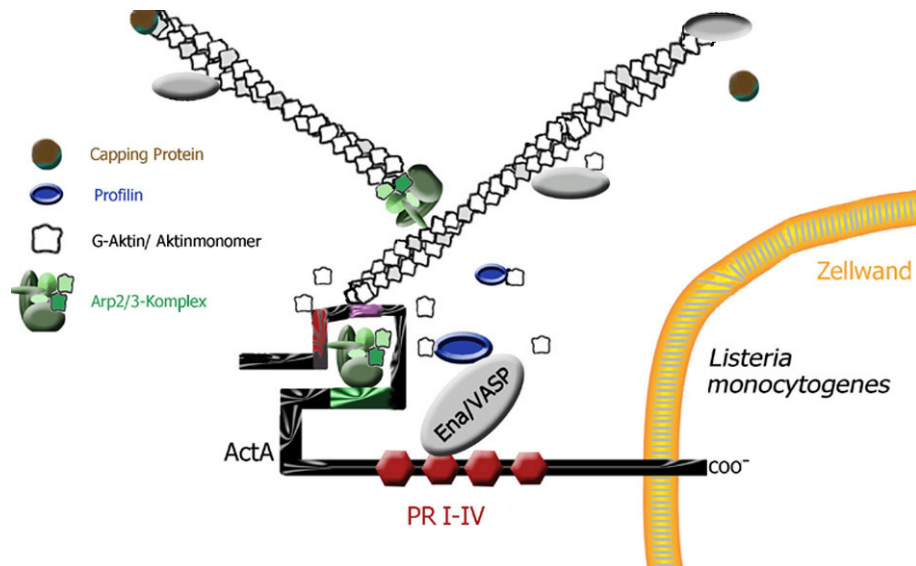
## 4.2 Rolle des ActA-Proteins

Für die Rekrutierung des Aktinskeletts der Wirtszelle ist nur ein Protein notwendig und auch hinreichend, das Oberflächenprotein *actin nucleator protein A* (ActA, Synonym: *actin assembly inducing protein A*). Das 639 Aminosäuren umfassende Protein ist carboxyterminal in der Listerienmembran verankert und scheint über Wechselwirkungen mit dem Heparansulfat-Proteoglykan-Rezeptor auf den Zielzellen partiell auch an der Internalisierung der Erreger beteiligt zu sein. Eine Deletion des Proteins vermindert die Adhäsion und Invasivität jedoch kaum (Alvarez-Dominguez *et al.*, 1997). Wesentlich drastischer sind die Effekte einer ActA-Deletion auf die Zell-zu-Zell-Ausbreitung und damit die Infektivität der Listerien. ActA-defiziente Stämme sind nicht fähig, Aktinschweife auszubilden, sich im Cytoplasma zu bewegen oder in andere Zellen zu gelangen; diese Stämme bilden Mikrokolonien im Wirtscytosol (Kocks *et al.*, 1992; Domann *et al.*, 1992). ActA enthält eine Reihe von Interaktionsmotiven für zelluläre Proteine, unter Anderem vier prolinreiche Motive (PR I-IV) für die Interaktion mit Ena/VASP-Proteinen (Niebuhr *et al.*, 1997; Chakraborty *et al.*, 1995) und ein basisches Motiv für den Arp2/3-Komplex, welcher die Ausbildung neuer Verzweigungen an den Aktinfilamenten induziert (Welch *et al.*, 1998). Ebenso sind Bindungsstellen sowohl für Aktin-Monomere als auch für filamentöses Aktin vorhanden (Lasa *et al.*, 1997). Auf diese Weise kann *Listeria monocytogenes* mit nur einem Adapterprotein alle für die Formung und Vergrößerung des Raketenschweifs nötigen Proteine zur Bakterienoberfläche rekrutieren und folglich einen schnellen Vortrieb in der Zelle bewirken, wobei die aktive Polymerisierung nur am vorderen Ende des Schweifs in der Nähe der Bakterienoberfläche stattfindet (Theriot *et al.*, 1992). ActA scheint für diese Prozesse in der Wirtszelle und ebenso für die Verbreitung zu weiteren Zellen absolut unabdingbar (Welch *et al.*, 1998;

Smith *et al.*, 1996; Skoble *et al.*, 2000; Pistor *et al.*, 1995; Laurent *et al.*, 1999). Auffällig ist, dass auch die Deletion der PR-Motive zu einer 50 % verminderten Virulenz des Pathogens führt und einer starken Verminderung der Motilität sowie der Frequenz der Aktinschweif-Entstehung (Smith *et al.*, 1996, Lasa *et al.*, 1997).

### 4.3 Ena/VASP-Proteine im Zuge der Aktin-Polymerisierung

Obwohl über die Notwendigkeit der Ena/VASP-Familie für die Polymerisierung Klarheit besteht, konnte die genaue Rolle dieser Adapterproteine bisher nicht geklärt werden (Auerbuch *et al.*, 2003). Interessanterweise wurden alle drei Paraloge Mena, VASP und Evl an den Raketenschweiften detektiert, obwohl die Gewebeverteilung der drei Proteine sehr variabel ist (Bear *et al.*, 2000; Gambaryan *et al.*, 2001; Lanier *et al.*, 1999). Die Affinität der Proteine zu dem bakteriellen Protein ActA ist hierbei höher als zu allen in der Wirtszelle vorkommenden Liganden (Niebuhr *et al.*, 1997, Prehoda *et al.*, 1999). Zudem wird durch Depletion dieser drei Proteine aus der Wirtszelle ein kompletter Motilitätsverlust der Listerien bewirkt (Laurent *et al.*, 1999). Das gängige Modell sieht die ortsspezifische Anreicherung von Profilin und damit von verfügbaren Aktinmonomeren als den Haupteffekt der Ena/VASP-Proteine auf die Aktinpolymerisierung vor (Ferron *et al.*, 2007; Krause *et al.*, 2003, Smith *et al.*, 1996). Für ActA allein konnte keine direkte Bindung des für die Motilität der Listerien notwendigen Profilins nachgewiesen werden; nur bei Anwesenheit von Ena/VASP-Proteinen kann dieses Protein in den Schweiften gefunden werden (Theriot *et al.*, 1994, Smith *et al.*, 1996). Profilin stimuliert in der Zelle die Aktinpolymerisierung am Minus-Ende der Filamente (Pantaloni *et al.*, 2001). Aber auch für die Ena/VASP-Proteine *per se* wird eine Stimulierung der Polymerisierung diskutiert, da die Motilität der Bakterien in einem zellfreien System durch die Zugabe von Profilin zwar verdoppelt, durch die Zugabe von VASP insgesamt jedoch verzehnfacht wird (Loisel *et al.*, 1999). Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist die Verhinderung der Anlagerung der *Capping*-Proteine durch die in der Nähe von wachsenden Filamenten gebundenen Ena/VASP-Proteine (Bear *et al.*, 2002). *Capping*-Proteine blockieren die weitere Polymerisierung der Aktinfilamente und wirken daher inhibitorisch auf das Wachstum des Schweifes (Pantaloni *et al.*, 2001).



**Abb. I.5:** Schema der Aktinnukleation am Raketenschweif.

Arp2/3: *Actin-related protein 2/3*-Komplex PRI-IV: Prolinreiche Motive zur Bindung von Ena/VASP-Proteinen.

Neben den Ena/VASP-Proteinen stimuliert wahrscheinlich auch der Arp2/3-Komplex die Aktinpolymerisierung an *Listeria monocytogenes*, obwohl der Komplex zwar notwendig, jedoch nicht ausreichend für die Ausbildung der Raketenschweif ist (Loisel *et al.*, 1999; Cameron *et al.*, 2001). Dieser Proteinverband scheint in Listerien, wie auch in der zellulären Aktinpolymerisierung, für die Ausbildung von neuen Aktinverzweigungen an den Filamenten zu sorgen (Mullins *et al.*, 1998).

Neben der stimulierenden Rolle auf die Aktinpolymerisierung wird als weitere Aufgabe der Ena/VASP-Proteine auch die Regulierung der Aktingeometrie diskutiert. Die Verdrängung des Capping-Proteins scheint hier ebenso Grundlage für die Ausbildung von längeren und unverzweigten Aktinfasern zu sein (Bear *et al.*, 2002; Skoble *et al.*, 2000). Eine mögliche Konkurrenz mit dem Arp2/3-Komplex ist gleichfalls denkbar, da dieser nur an offenen Minus-Enden Verzweigungen einführen kann, welche von Ena/VASP-Proteinen bevorzugt gebunden werden (Ichetovkin *et al.*, 2002). Überdies sind Aktinfilamente bei Depletion der Ena/VASP-Proteine lose auf der Bakterienoberfläche verteilt und nicht zu Schweifen gebündelt (Laurent *et al.*, 1999). Wahrscheinlich übernehmen Ena/VASP-Proteine sowohl die Stimulation der Aktinpolymerisierung sowie die Steuerung der Aktingeometrie im Raketenschweif. Eine schematische Übersicht der für

die Polymerisierung notwendigen Proteine im *Listeria monocytogenes*-System ist in Abb. I.5 dargestellt.

Eine Vielzahl von Untersuchungen mit teilweise gegensätzlichen Ergebnissen konnte zwar einige Details des Prozesses, jedoch bisher keinen klaren Mechanismus für die Vorgänge der Aktinpolymerisierung an den Listerien liefern (Goldberg, 2001).

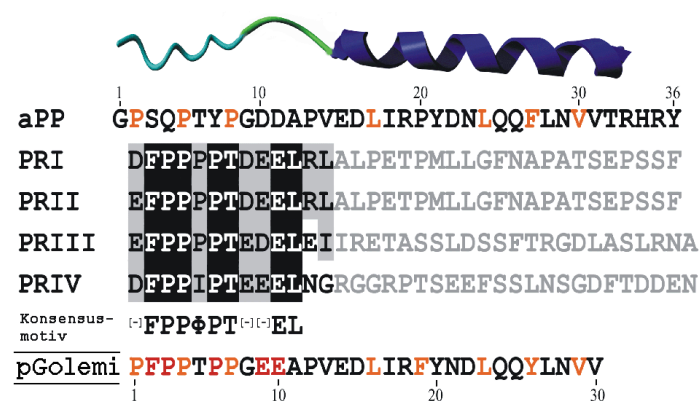
## 5. Erstellung von Mimetika für das EVH1:ActA-System

Um die paralog-spezifischen Aufgaben der Ena/VASP-Mitglieder bei der Aktinpolymerisierung im Modellorganismus *Listeria monocytogenes* sowie in der Zelle besser zu verstehen, wurden vor Kurzem synthetische Mimetika für den Liganden (ActA) sowie für die bindende Region der Domäne entworfen.

### 5.1 Das Miniaturprotein pGolemi

Die Notwendigkeit einer starren Polyprolin-Helix Typ II für die Bindung von Liganden an EVH1-Domänen (Ball *et al.*, 2002) veranlasste Golemi-Kotra *et al.* (2004), ein stabiles Peptidgerüst mit einer ausgeprägten PPII-Helix durch Aminosäureaustausche in einen

hochaffinen EVH1-Binder zu verwandeln. Als Basis diente das Peptidhormon *avian pancreatic peptide* (aPP), das aus dem Pankreas von Truthähnen isoliert wurde (Kimmel *et al.*, 1975). Das Polypeptid weist eine typische *pancreatic peptide*-Faltung mit einer kurzen PPII-Helix am Aminoterminal auf, deren Konformation durch Wechsel-



**Abb. I.6:** Sequenzvergleich zwischen aPP, den PR-Motiven von ActA und pGolemi. Das Konsensusmotiv wurde aus Niebuhr *et al.*, 1997 entnommen.

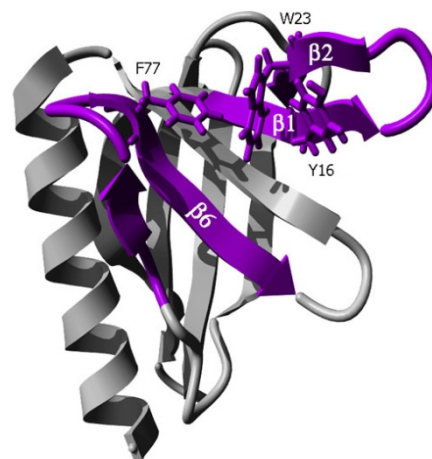
wirkungen mit einer amphipathischen, carboxyterminalen Helix stabilisiert wird (Blundell *et al.*, 1981; Glover *et al.*, 1983). Durch den Austausch von fünf Aminosäuren

und die Deletion des aminoterminalen Glycins sowie fünf weiterer carboxyterminaler Aminosäuren (Abb. I.6) wurde das synthetische Peptid pGolemi erstellt (Golemi-Kotra *et al.*, 2004). Hierbei wurde darauf geachtet, das von Niebuhr *et al.* (1997) gefundene Konsensusmotiv für die Bindung an EVH1-Domänen nicht zu unterbrechen.

Für pGolemi wurde bereits eine hochaffine Bindung an Mena EVH1-Domänen mit einer 10fach erhöhten Affinität im Vergleich zu einem Peptidliganden aus dem ersten prolinreichen Motiv (PRI) aus ActA festgestellt (Golemi-Kotra *et al.*, 2004). Außerdem weist das Peptid eine im Gegensatz zu den anderen Ena/VASP-Mitgliedern erhöhte Affinität zu Mena auf (Holtzman *et al.*, 2007). Allerdings sind bisher noch keine molekularen oder strukturellen Details dieser hochaffinen und paralog-spezifischen Bindung bekannt.

## 5.2 Das Domänenmimetikum P11

Auch für die Mena EVH1-Domäne wurde ein synthetisches Mimetikum der Bindungsstelle erstellt. Basierend auf der Mena EVH1-Struktur im Komplex mit einem FP<sub>4</sub>-Pentapeptid (PDB-Eintrag 1evh; Prehoda *et al.*, 1999) wurden in einem kombinatorischen Peptidsyntheseverfahren verschiedene Verknüpfungen der bindenden Regionen der Mena EVH1-Domäne, entsprechend den Aminosäurepositionen 13-26 und 70-81, für die Bindung optimiert. Eine besondere Herausforderung bei der Nachbildung der Ligandenbindungsregion stellte die Verteilung auf drei verschiedenen Faltblattsträngen dar (Abb. I.7). Daher wurden die beiden Sequenzen über chemische Abstandhalter und *Linker*-Gruppen verbun-



**Abb. I.7:** Bänderdarstellung der Mena EVH1-Domäne. Die für P11 verwendeten Sequenzbereiche sind violett gefärbt, die hydrophobe Triade als Stäbchen und nummeriert gezeigt.



den, die eine räumlich gleiche Konfiguration der bindenden Reste ermöglichen sollten. Die Peptide wurden zusätzlich durch Zyklisierung, Amidierung und Acetylierung sowie umgekehrte Sequenz-Orientierungen modifiziert und einem kompetitiven ELISA-Test mit pGolemi unterworfen (Hunke *et al.*, 2006). Als bester Binder stellte sich P11 mit einer  $IC_{50}$  von 5  $\mu$ M heraus. Dieses Domänenmimetikum besitzt eine Acetylierung und Amidierung am Amino- bzw. Carboxyterminus und die Reste 13 bis 26 sind zyklisiert. Der aminoterminalen Makrolaktamring ist durch einen Abstandshalter (*Spacer*) aus einer  $\epsilon$ -Aminohexansäure sowie einem Thioether zwischen einem eingefügten Cystein und einem Acetatrest mit den carboxyterminalen Resten verbunden.

Obwohl indirekt eine Bindung an pGolemi über ELISA-Kompetitionsexperimente nachgewiesen werden konnte (Hunke *et al.*, 2006), gibt es für dieses synthetische Domänenmimetikum bisher noch keine weiteren Daten über die Bindung. Da dieser synthetische Binder für prolinreiche Sequenzmotive jedoch als potentieller Antagonist für ActA und folglich als Behandlungsansatz gegen Listeriose dienen könnte, hat ein molekulares Verständnis der Bindung hohe therapeutische Relevanz.

## II. ZIELSETZUNG

Ena/VASP-Proteine sind wesentliche Bestandteile der Aktinpolymerisierungs-Maschinerie in Lamellipodien und Filopodien (Kap. I.2.3). Diese Proteine können die Geometrie der entstehenden Aktinfasern jedoch nur beeinflussen, wenn deren Ena/VASP-Homologie 1 (EVH1)-Domänen mit prolinreichen Liganden im Cytoskelett interagieren und somit eine korrekte Lokalisierung gewährleisten. Auch der Nahrungsmittelkeim *Listeria monocytogenes* macht sich den Rekrutierungsmechanismus über prolinreiche Sequenzmotive zu Nutze, um zelluläre EVH1-domänenhaltige Proteine nach dem Eintritt in die Wirtszelle an seiner Oberfläche zu binden und deren physiologische Aufgaben zu usurpieren (Kap. I.4). Für beide Prozesse wurden bereits eine Reihe von beteiligten Proteinen identifiziert; deren molekularen Wirkweisen konnten bisher jedoch nicht geklärt werden (Auerbuch *et al.*, 2003). Ein hochaffiner, synthetischer Binder für *Mammalian Enabled* (Mena) EVH1-Domänen, pGolemi, wurde daher erstellt, um das Bindungsverhalten von ActA an diese Domäne besser zu beleuchten (Golemi-Kotra *et al.*, 2004). Die genauen Mechanismen dieser hochaffinen Bindung müssen jedoch noch im Detail untersucht werden.

Für ein exaktes Verständnis der Bindung an EVH1-Domänen sind atomare Details unerlässlich. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit zunächst die räumliche Struktur von pGolemi in Lösung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden und in einem weiteren Schritt die Interaktion des Miniaturproteins mit einem synthetischen EVH1-Domänenanalog, P11, über die gleichen Technik untersucht werden. Anhand dieser Informationen können der Bindungsmechanismus des synthetischen Liganden auf molekularer Ebene sowie die Gründe für die stark erhöhte Affinität von pGolemi zu Mena geklärt werden.

Die Interaktion von prolinreichen Sequenzen mit prolinbindenden Domänen ist oft durch starre Wechselwirkungen und niedrige Affinitäten gekennzeichnet und daher wegen ungünstiger Dynamiken für die NMR-Zeitskala spektroskopisch nicht nachweisbar. Sollte dies auch für die Bindung von pGolemi an P11 der Fall sein, eröffnet sich hier zusätzlich

die Möglichkeit, Homologiemodelle zu erstellen. Angesichts der Fülle an strukturellen Daten über die konservierten EVH1-Domänen können so mehr Informationen über die paralog-spezifische Bindung von pGolemi an P11 und die Mena EVH1-Domäne sowie die Determinanten dieser Bindung gewonnen werden.

Insgesamt soll in der vorgelegten Arbeit mit Hilfe der strukturellen Informationen über die Bindung von pGolemi an EVH1-Domänen ein besseres Verständnis der Affinitätsunterschiede zu den einzelnen Paralogen gewonnen werden. Mit diesen Informationen wird die Gestaltung weiterer paralog-spezifischer Miniaturproteine erheblich erleichtert. Durch gezielte Depletion einzelner Familienmitglieder über Injektion dieser spezifischen Liganden kann im Folgenden mehr über deren physiologische Rolle in den Lamellipodien sowie bei der Aktinschweifbildung des Nahrungsmittelkeims *Listeria monocytogenes* erfahren werden. Nicht zuletzt stellt ein System aus hochaffin bindenden Mimetika der ActA-EVH1-Interaktion, welche für die Infektivität des Pathogens ausschlaggebend ist, einen möglichen Therapieansatz für die schlecht zu behandelnden Listerien-Infektionen dar.

### III. MATERIALIEN UND METHODEN

#### 1. Chemikalien und Geräte

##### 1.1 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Seelze) und Merck (Darmstadt) in den Reinheitsgraden *per analysi* oder „für die Molekularbiologie“ bezogen.

D<sub>2</sub>O (100% Atom D): Sigma (Seelze)

D<sub>2</sub>O (99,9% Atom D): Deutero (Kastellaun)

Spritzenvorsatzfilter aus regeneriertem Zellulosemischester in den Porengrößen 0,22 µm und 0,45 µm: Sartorius (Göttingen)

Membranfilter zur Vakuumfiltration in den Porengrößen 0,22 µm und 0,45 µm (ExpressPlus™ Membran): Millipore (Bedford, USA)

##### 1.2 Geräte

Ultrashield™ Plus 400 NMR-Spektrometer (Bruker BioSpin, Fällanden)

Ultrashield™ 700 NMR-Spektrometer (Bruker BioSpin, Fällanden)

Gefriertrocknungsanlage alpha 2-4 LD plus (Christ, Osterode)

Hochvakuumpumpe RZ 2.5 (Vacuubrand GmbH, Wertheim)

pH-Meter 766 Calimatic mit SE100 Elektrode (Knick, Berlin)

Reinstwasseranlage MilliQ (Millipore, Bedford, USA)

Tisch-Kühlzentrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg)

Tischzentrifuge MiniSpin Plus (Eppendorf, Hamburg)

## 1.3 Rechner und Software

### Rechner für Simulationen:

Dell Optiplex 745 mit zwei Intel®Core™2 @1,86 GHz-Prozessoren

### Softwarepakete

Spektrenaufnahme, Prozessierung: TopSpin 2.0 (Bruker, Karlsruhe)

Zuordnung, Integration: AUREMOL (Bruker, Rheinstetten;  
Gronwald und Kalbitzer, 2004)

Strukturberechnung: Xplor-NIH 2.18 (Schwieters *et al.*, 2003,  
Schwieters *et al.*, 2006)

Molekulardynamik, Homologiemodellierung: YASARA Twinset  
(Krieger *et al.*, 2002)

Ramachandran-Plots für pGolemi: RamPage (Lovell *et al.*, 2003)

Visualisierung: YASARA Twinset (Krieger *et al.*, 2002)

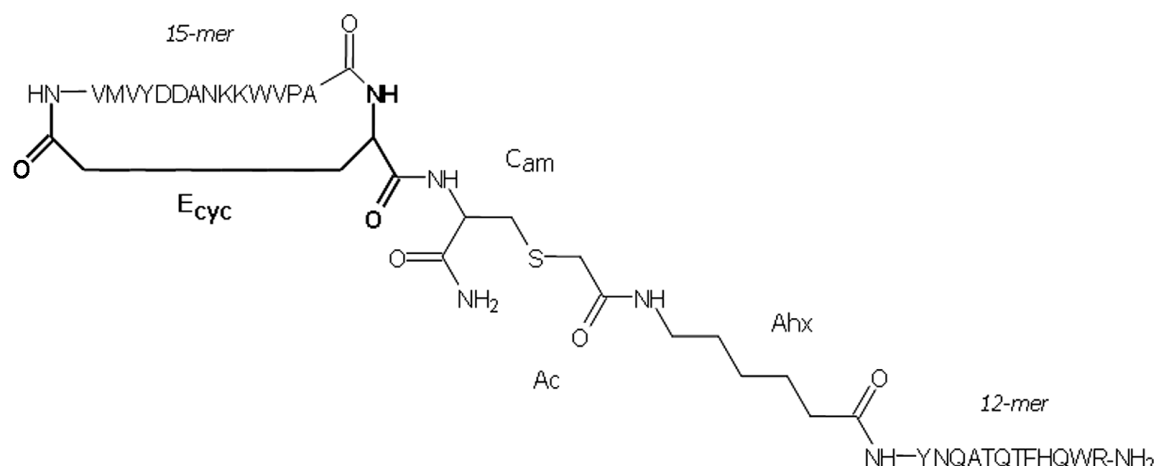
Pymol (DeLano Scientific LLC, Palo Alto, USA)

## 2. Peptidsynthese

Die in dieser Arbeit untersuchten Peptide (Tab. III.1) wurden von Dr. Cornelia Hunke in der Gruppe von Prof. Jutta Eichler (Konformationelle Protein-Ligand Wechselwirkungen) am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, synthetisiert.

### 2.1 Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Peptide

Während in pGolemi nur natürlich vorkommende Aminosäuren enthalten sind, stellt P11 ein zyklisches Peptid mit Isopeptidbindungen, chemischen *Spacern* und einer Thioetherbindung dar. Zur Verdeutlichung ist die Primärstruktur von P11 in Abbildung III.1 gezeigt.



**Abb. III.1:** Primärstruktur von P11. Die chemischen Komponenten sind mit den jeweiligen Abkürzungen (Tab. III.1) angegeben, der zyklische Glutamatrest ist fett hervorgehoben.

**Tab. III.1:** Aminosäuresequenz der in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Peptide

Name	Sequenz	Länge
pGolemi	PFPPTPPGEEAPVEDLIRFYNDLQQYLNVV-NH <sub>2</sub>	30-mer
	VMVYDDYNNKKWVPAE <sub>Ecyc</sub> -	15-mer-
P11	Cam-Ac-Ahx-	Linker-
	YNQATQTFHQWR-NH <sub>2</sub>	12mer

Abkürzungen: E<sub>cyc</sub>: zyklisches Glutamat, C<sub>am</sub>: amidiertes Cystein; Ac: Acetylrest;  
Ahx: ε-Aminohexansäure, NH<sub>2</sub>: amidiierter Carboxyterminus

## 2.2 Synthese von pGolemi

Das Peptid pGolemi wurde als carboxyterminales Amid über Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-basierte Festphasenpeptidsynthese an dem automatisierten Peptidsynthesizer SYRO (MultiSynTech, Witten) hergestellt. Als Matrix diente TentaGel S RAM-Harz (0,25 mmol/g; Rapp Polymere, Tübingen). Die Fmoc-modifizierten-Aminosäuren (5 Äquivalente) wurden in einem Gemisch aus N,N-Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 1-Hydroxy-1H-Benzotriazol-Hydrat (HOBt) in Dimethylformamid (DMF) über einen Standard-Kopplungszyklus von 90 Minuten gekoppelt. Der Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % Piperidin in DMF (20 min) folgte die Spaltung des fertigen Peptids vom Resin durch Inkubation mit einem Trifluoressigsäure (TFA)/Dichlormethan (DCM)/Triisopropylsilan/Wasser-Gemisch im Verhältnis 70:20:5:5 über zwei Stunden. Nach der

Fällung mit kaltem Cyclohexan/*tert*-Butylmethylether (1:1-Gemisch) und Extraktion mit Wasser wurde pGolemi zweimal lyophilisiert. Zur Reinigung des Peptids wurde anschließend eine präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt (Säule: Nucleosil RP18, Größe des Säulenbetts: 250 × 10 mm; Macherey-Nagel, Düren) Die Trennung erfolgte über einen Gradienten von 5 – 65 % Acetonitril in Wasser mit jeweils 0,1 % TFA-Gehalt bei einer Flussrate von 3 ml/min und UV-Detektion bei 220 nm. Zur Analyse der Fraktionen wurde eine analytische HPLC mit angeschlossener ESI-MS-Detektion (LC/MS) bei einer Flussrate von 0,4 ml/min im selben Laufmittel durchgeführt (Säule: PLRP-S 100, Porengröße 3 µm; Größe des Säulenbetts 50 × 2,1 mm; Varian, Middelburg, Niederlande).

## 2.3 Synthese von P11

Die Darstellung des zyklischen Bindungsstellenanalogons der Ena/VASP-Homologie 1 (EVH1)-Domäne des *Mammalian Enabled* (Mena) Proteins (P11) erfolgte durch chemische Ligation zweier Vorläuferfragmente über Thioetherkopplung. Die Fragmente wurden, wie pGolemi (Kap. III.2.2), als carboxyterminales Amid in Festphasensynthese an einer TentaGel S RAM-Matrix (0,25 mmol/g; Rapp Polymere, Tübingen) mit Hilfe des automatischen Peptidsynthesizers SYRO (MultiSynTech, Witten) synthetisiert. Der Standardkopplungszyklus wurde mit 5 Äquivalenten Fmoc-modifizierter Aminosäure als Gemisch mit DIC/HOBt im Lösungsmittel DMF in 60 Minuten durchgeführt.

Zur Zyklisierung des aminoterminalen Vorläufers (<sup>1</sup>VMVYDDANKKWPA<sup>14</sup>) wurde ein Glutamat mit Seitenketten-Allyl-Protektion eingeführt. Dieser Allylester wurde vor der eigentlichen Reaktion durch Inkubation mit Tetrakis-(Triphenylphosphin)-Palladium (8,6 mg/ml) und 1,3-Dimethylbarbitursäure (13 mg/ml) in DMF/Tetrahydrofuran (5:2) unter Argonatmosphäre über Nacht gespalten. Die Zyklisierungsreaktion erfolgte am Resin durch Ausbildung einer Amidbindung zwischen der Aminogruppe des Valins und der γ-Carboxylgruppe des Glutamats in fünf Äq. Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinphosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP)/HOBt und 10 Äq. Diisopropylethylamin über Nacht. Schließlich wurde an den Makrolaktamring als carboxyterminale Aminosäure ein

amidiertes Cystein gekoppelt. Der carboxyterminale Vorläufer der finalen Peptidsequenz (Ahx-<sup>19</sup>YNQATQTFHQWR-NH<sub>2</sub><sup>30</sup>) wurde für die spätere Thioetherkopplung zusätzlich am Aminoterminus mit Bromessigsäure (10 Äq.) aktiviert.

Die synthetisierten Vorläufer wurden nach Fmoc-Entschützung (Kap. III.2.2) durch Inkubation mit einer Mischung aus TFA/DCM/Triisopropylsilan/Wasser (70:20:5:5) für zwei Stunden vom Harz gespalten, in kaltem Cyclohexan/*tert*-Butylmethylether (1:1) präzipitiert, anschließend mit Wasser extrahiert und doppelt lyophilisiert. Die Peptide wurden dann über analytische HPLC (Laufbedingungen und Säule wie unter Kap. III.2.2) mit angeschlossener ESI-MS-Detektion verifiziert und über präparative HPLC (siehe Kap. III.2.2) gereinigt. Beide Vorläuferpeptide wurden in einem Volumen von 50 ml zu einer Konzentration von jeweils 2,5 mM in 50 % Acetonitril/Wasser gemischt und nach Zugabe von 100 ml Phosphatpuffer (pH 9,2) über Nacht zum Reagieren gebracht. Die komplette Umsetzung der Sulfhydrylgruppen wurde durch einen negativen Ellman-Test (Ellman, 1959) und anschließende LC-MS bestätigt. Das korrekt synthetisierte Peptid wurde über präparative HPLC (siehe Kap. III.2.2) gereinigt und zur weiteren Lagerung lyophilisiert.

### 3. NMR-Spektroskopie

#### 3.1 Probenvorbereitung

Für die Aufnahme der NMR-Spektren wurden beide Peptide in einer Endkonzentration von 1 mM in 600 µl eines 45 mM Kaliumphosphatpuffers, pH 7,0; 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub>; 10 % (v/v) D<sub>2</sub>O gelöst. Zur Entfernung von Schwebeteilchen wurden die Peptidlösungen bei 13 000 × g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Messungen erfolgten in 5 mm-ThinWall-Probenröhrchen (Ampol, Lomza, Polen). Zur Wiederverwendung der NMR-Proben wurde diesen durch Gefriertrocknung komplett die Flüssigkeit entzogen (Kap. III.3.2) und die getrockneten Proben für weiterführende Messungen, wie etwa in 100 % D<sub>2</sub>O oder als Komplex, erneut gelöst. Die Stöchiometrie der beiden Peptide in den Komplexmessungen betrug 1:1.



## 3.2 Gefriertrocknung der Peptide

Die gelösten Peptide wurden zur längeren Aufbewahrung oder zur Messung in 100 % D<sub>2</sub>O zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und an der Christ-Gefriertrocknungsanlage (Kap. III.1.2) bis zur vollständigen Trockene eingengt. Je nach Probenvolumen wurden die Proben 12 bis 24 Stunden bei einer Eiskondensatortemperatur von -62 °C für die Haupttrocknung lyophilisiert und weitere 12 bis 18 Stunden bei einer Eiskondensatortemperatur von -76 °C nachgetrocknet. Die gefriergetrockneten Peptide wurden anschließend entweder bei 4 °C gelagert oder für NMR-Messungen in 100 % D<sub>2</sub>O gelöst (s. Kap. III.3.3).

## 3.3 Geräte und Messbedingungen

Die Messungen wurden an Bruker Ultrashield™ Plus 400- und Ultrashield™ 700-Geräten (Bruker BioSpin, Fällanden) bei Protonenresonanzfrequenzen von 400,13 und 700,22 MHz durchgeführt. Als Probenköpfe wurden ein inverser Breitbandprobenkopf für <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N/<sup>31</sup>P (400 MHz) sowie ein inverser Tripelresonanz-Cryo-Probenkopf (700 MHz) mit jeweils aktiv abgeschirmten Gradientenspulen in allen drei Raumrichtungen verwendet. Die Experimente wurden bei 300 K durchgeführt, die Temperatur wurde über eine BVT3200 bzw. BVT3000-Kontrolleinheit (Bruker BioSpin, Fällanden) gesteuert. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit Ausnahme der COSY-Spektren im phasensensitiven Modus mit Quadraturdetektion in beiden Zeitdimensionen unter Verwendung der *States-time-proportional-phase-incrementation*-Technik (States-TPPI; States et al., 1982; Marion et al., 1989).

Als interner Feldfrequenz-Lock diente der Probe zugesetztes D<sub>2</sub>O. Die ppm-Werte der Protonenfrequenzen wurden gegen 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (DSS) in D<sub>2</sub>O als externem Standard geeicht. Die Unterdrückung der Wasserresonanz erfolgte, bis auf 1D-<sup>1</sup>H- und COSY-Experimente, über die 3-9-19-WATERGATE-Pulsfolge (Piotto *et al.*, 1992; Sklenar *et al.*, 1993). In Tabelle III.2 sind alle durchgeführten NMR-Experimente mit den zugehörigen Pulsprogrammen und den wichtigsten Parametern aufgeführt. Die Pulsprogramme wurden aus dem Bio-Package der Bruker-Standardbibliothek

übernommen. Die Mischzeiten für NOESY-Experimente betrugen 100 und 200 ms, die für TOCSY-Experimente 80 ms.

Zum Nachweis von langsam austauschenden Amidprotonen wurde zusätzlich eine Probe von pGolemi gefriergetrocknet (Kap. III.3.2), in 100 % D<sub>2</sub>O gelöst und sofort ein NOESY-Experiment mit  $512 \times 2048$  komplexen Datenpunkten in 48 Akkumulationen aufgenommen (Kap. III.3.5.5).

**Tab. III.2:** Zusammenstellung der für die einzelnen Proben durchgeführten NMR-Experimente.

Experiment	F1			F2		Referenz
<i>Pulsprogramm</i>	NS <sup>1</sup>	SW <sup>2</sup> (Hz)	TD <sup>3</sup>	SW <sup>2</sup> (Hz)	TD <sup>3</sup>	
<u>1 mM pGolemi in 45 mM Kaliumphosphat, pH 7,0</u>						
<sup>1</sup> H <i>zgpr</i>	64	8417,51	16384			
COSY <i>cosypggrqf</i>	64	7002,24	512	7002,81	2048	Aue <i>et al.</i> , 1976
TOCSY <i>mlevgpph19</i>	48	11203,59	512	11160,71	2048	Braunschweiler und Ernst, 1983 Bax und Davis, 1985
NOESY <i>noesygpph19</i>	48	11203,59	512	11160,71	512	Jeener <i>et al.</i> , 1979
DQF-COSY <i>cosydfphpr</i>	48	7002,24	512	7002,8	2048	DeRome und Williamson, 1989
<u>1 mM P11 in 45 mM Kaliumphosphat, pH 7,0</u>						
<sup>1</sup> H <i>zgpr</i>	32	8417,51	16384			
COSY <i>cosypggrqf</i>	64	7002,24	512	7002,82	2048	Aue <i>et al.</i> , 1976
TOCSY <i>mlevgpph19</i>	64	11203,59	512	11160,71	2048	Braunschweiler und Ernst, 1983 Bax und Davis, 1985
NOESY <i>noesygpph19</i>	48	11203,59	512	11160,71	2048	Jeener <i>et al.</i> , 1979

Experiment <i>Pulsprogramm</i>	NS <sup>1</sup>	F1		F2		Referenz
		SW <sup>2</sup> (Hz)	TD <sup>3</sup>	SW <sup>2</sup> (Hz)	TD <sup>3</sup>	
<u>1 mM pGolemi:1 mM P11 in 45 mM Kaliumphosphat, pH 7,0</u>						
<sup>1</sup> H <i>zgpr</i>	32	8417,51	16384			
COSY <i>cosygpprqf</i>	64	7002,24	512	7002,801	2048	Aue <i>et al.</i> , 1976
TOCSY <i>mlevgpph19</i>	64	11203,59	512	11160,70	2048	Braunschweiler und Ernst, 1983 Bax und Davis, 1985
NOESY <i>noesygpph19</i>	64	11203,59	512	11160,71	2048	Jeener <i>et al.</i> , 1979

1: Zahl der gemessenen Scans 2: spektrale Breite in Hertz

3: Zahl der realen Punkte in der jeweiligen Dimension

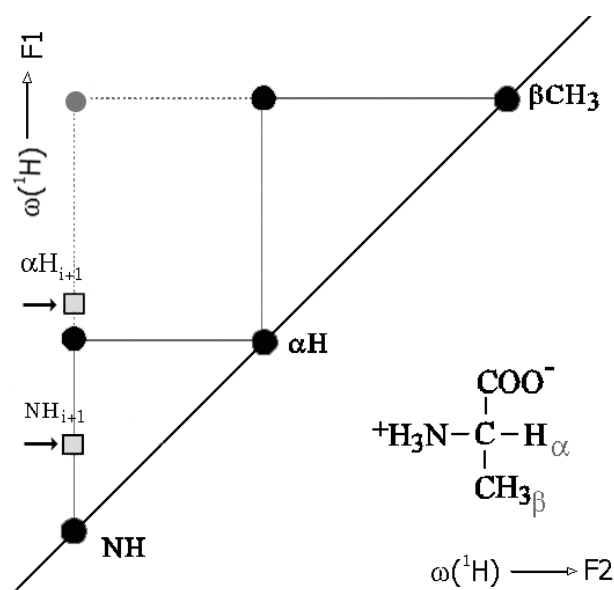
### 3.4 Prozessierung der Spektren

Die Prozessierung der Spektren erfolgte mit dem Programm Topspin 2.0 (Bruker BioSpin, Rheinstetten). Zur Verbesserung der digitalen Auflösung der zweidimensionalen Spektren wurden alle *free induction decays* (FIDs) vor der Fourier-Transformation (FT) in F1 auf eine Menge 2048 Datenpunkte aufgefüllt (*zero-filling*). Als Filterfunktionen wurden  $\pi/4$  bis  $\pi/2$ -verschobene Sinus- oder Sinusquadratfunktionen verwendet (Cavanagh *et al.*, 2007). Standardmäßig wurde eine Basislinienkorrektur über den Befehl *abs* durch Subtraktion einer Polynomialfunktion fünften Grades in beiden Dimensionen durchgeführt.

### 3.5 Auswertung der Spektren

#### 3.5.1 Sequentielle Zuordnung der Protonenresonanzen

Nach der Prozessierung der Spektren wurden diese mit dem Programm AUREMOL (Bruker, Rheinstetten) manuell zugeordnet. Zur Gewinnung von Distanzbeschränkungen im Raum müssen zunächst die einzelnen NMR-Signale des Spektrums den jeweiligen Aminosäuren zugeordnet werden. Hierfür wurden *correlated spectroscopy*- (COSY;



Aue *et al.*, 1976), *total correlated spectroscopy*- (TOCSY; Braunschweiler und Ernst, 1983; Bax und Davis, 1985) und *nuclear Overhauser enhancement spectroscopy*- (NOESY; Jeener *et al.*, 1979; Bodenhausen *et al.*, 1984) Spektren herangezogen. Während im COSY-Spektrum nur vicinal, also über eine Reichweite von drei chemischen Bindungen, gekoppelte Kerne zu sehen sind, kann im TOCSY-Spektrum der Magnetisierungstransfer über alle durch skalare Kopplung verbundenen Wasserstoffprotonen detektiert werden. Hierdurch wird eine eindeutige Identifizierung der enthaltenen Aminosäuren anhand ihrer Spinsysteme möglich. Da NOE-Kreuzresonanzen (NOE) über dipolare Kopplungen im Raum bis zu einem Abstand von etwa 5 Å entstehen, erscheinen im NOESY-Spektrum neben den Resonanzen des eigenen Spinsystems auch Signale von sequentiell oder strukturell angrenzenden Protonen. So können in Kombination mit der Primärsequenz des Proteins über das sogenannten *Chain Tracing* nach Wüthrich (1986) mit Hilfe von  $H_{\alpha}$ - $H_N$ -Kreuzresonanzen alle Aminosäuren sequentiell zugeordnet werden (siehe Abb. III.2). Diese Methode nutzt das Vorhandensein von NOE-Kreuzsignalen der folgenden Aminosäure im Spinsystem, um für das jeweilige System eine eindeutige Sequenzposition zuzuordnen. Diese Positionsinformationen ermöglichen dann die Ableitung von Distanzbeschränkungen über die Volumina der NOE-Kreuzresonanzen.

### 3.5.2 Ableitung der Distanzbeschränkungen

Nach der vollständigen Zuordnung wurden die Volumina der Kreuzresonanzen im Programm AUREMOL (Gronwald und Kalbitzer, 2004), unter Berücksichtigung eines aus der durchschnittlichen Halbwertsbreite der Signale (*line width at half height*) berechneten Standardfehlers für Volumen und Form der Resonanzsignale, integriert. Über Kalibrierung der NOE-Signalintensitäten gegen den Abstand zwischen den  $\delta$ - und  $\varepsilon$ -Protonen einer im Protein enthaltenen aromatischen Aminosäure (Wüthrich, 1986) wird eine Liste aller NOE-Kreuzresonanzen mit entsprechenden Abständen in Ångström erstellt (Kap. VI.1). Diese Liste diente als Randbedingung für die anschließende Strukturberechnung (Kap. III.4.3).

### 3.5.3 Erstellen einer Vorhersage der dihedralen Winkel mit Hilfe von TALOS

TALOS (Cornilescu *et al.*, 1999) ist eine datenbankbasierte Methode zur Vorhersage der  $\varphi$ - und  $\psi$ -Winkel des Peptidrückgrates, in welche prinzipiell Werte der chemischen Verschiebung für  $H_{\alpha}$ -,  $C_{\alpha}$ -,  $C_{\beta}$ -, CO- und N-Resonanzen einfließen können. In dieser Arbeit wurde auf Grund des homonuklearen Datensatzes jedoch nur die  $H_{\alpha}$ -Verschiebung berücksichtigt.

TALOS nutzt die Korrelation zwischen der Differenz in chemischer Verschiebung und der Sekundärstruktur (Kap. III.3.5.4) aus, um quantitative Voraussagen über die Natur der Torsionswinkel zu machen und basiert auf der Annahme, dass Aminosäuren bei ähnlichen Verschiebungswerten im Spektrum auch ähnliche Torsionswinkel aufweisen. Hierfür werden die chemischen Verschiebungen des Proteins in Triplet-Schritten mit der Verschiebungsdatenbank verglichen. Für jede Aminosäure wird der Durchschnittswert der jeweils zehn bestgeeigneten Vorhersagen mit Standardabweichung - je nach Konsistenz der vorhergesagten  $\varphi$ - und  $\psi$ -Winkel - angegeben. Die Vorhersagen werden im graphischen Interface des Programms dann als „gut“, „mittel“ oder „schlecht“ kategorisiert.

Die Winkelvorschläge wurden als zusätzliche Randbedingung für die Strukturberechnung (Kap. III.4.3; Kap. VI.3) eingesetzt. Für die Strukturberechnung von

pGolemi wurden nur „gute“ Vorhersagen verwendet, also Winkel mit kleiner Standardabweichung.

### 3.5.4 Analyse der Sekundärstruktur nach Wishart

Anhand der ermittelten Werte für die chemische Verschiebung der  $^1\text{H}_\alpha$ -Protonen wurde eine Sekundärstrukturanalyse nach Wishart (Wishart *et al.*, 1992; Wishart und Sykes, 1994) durchgeführt. Diese nutzt die Korrelation der Anwesenheit von geordneten Sekundärstrukturen mit der Änderung der chemischen Verschiebungen aus: liegt eine helikale Anordnung der Aminosäuren vor, sind die  $\text{H}_\alpha$ -Protonen im Vergleich zu ungeordneten Abschnitten zu hohem Feld verschoben, bei einer  $\beta$ -Faltblattstruktur zu tiefem Feld (Wishart *et al.*, 1991). Nach der Berechnung der sekundären chemischen Verschiebungen durch Differenzbildung zu den Werten der  $\text{H}_\alpha$ -Protonen im Zufallsknäuel ( $\Delta\delta = \delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{RC}}$ ) wurde für jeden Rest ein Verschiebungsindex (CSI, *chemical shift index*) bestimmt. Bei einem Wert von  $\Delta\delta$  größer als 0,1 ppm wurde ein Index von 1, bei einem Wert von  $\Delta\delta$  kleiner als -0,1 ppm ein Index von -1, ansonsten ein Index von 0 zugeordnet. Ist in der Sequenz an drei aufeinanderfolgenden  $\text{H}_\alpha$ -Spins ein Verschiebungsindex von 1 vorhanden, kann von einem Faltblatt ausgegangen werden, folgen vier Werte von -1 aufeinander, liegt eine Helix vor. Trägt man den Index in einem Graphen gegen die Aminosäureposition auf, können dementsprechend die einzelnen Sekundärstrukturelemente zugeordnet werden.

## 4. Strukturaufklärung

Für eine akkurate Berechnung der räumlichen Struktur von so komplexen Systemen wie Proteinen werden weit mehr Parameter benötigt als aus den reinen NMR-Randbedingungen zu gewinnen wären (Clore und Gronenborn, 1998). Daher stützt sich die computergestützte Strukturaufklärung zusätzlich auf empirische Konstanten für Geometrie, Bindungslängen, Bindungswinkel und nichtkovalente Wechselwirkungen, die in Kombination mit den experimentell bestimmten Randbedingungen zu einer hinreichend genauen Bestimmung der Struktur führen.

## 4.1. Das Xplor-NIH-Kraftfeld

Das in dieser Arbeit zur Strukturberechnung verwendete Programm Xplor-NIH wurde ausgehend von früheren CNS/XPLOR-Versionen durch Implementation von NMR-spezifischen Bibliotheken, Parametern und Funktionen speziell für die Strukturauflösung anhand von NMR-Datensätzen weiterentwickelt (Schwieters *et al.*, 2003; Schwieters *et al.*, 2006). Xplor-NIH basiert auf dem Molekulardynamik- und Minimierungsprogramm CHARMM (Brooks *et al.*, 1983) und dessen empirischem Kraftfeld. Daher erfolgt die Berechnung der Struktur in einem an CHARMM angelehnten Kraftfeld über die Minimierung einer Zielfunktion, die folgende energetische Terme beinhaltet (Gl. 1):

$$E_{\text{pot}} = E_{\text{bonds}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{dih}} + E_{\text{impr}} + E_{\text{vdW}} + (E_{\text{RAMA}}) + W_{\text{exp}} \cdot E_{\text{exp}} \quad \text{Gl. 1}$$

Der Gesamtterm der potentiellen Energie ( $E_{\text{pot}}$ ) setzt sich aus den Potentialtermen, also aus der Energie

- der chemischen Bindungen ( $E_{\text{bonds}}$ ),
- der Winkel zwischen den Atomen ( $E_{\text{angle}}$ ),
- der Diederwinkel ( $E_{\text{dih}}$ ),
- der Winkel zwischen Molekülebenen, welche für die richtige Konfiguration in chiralen Zentren sowie für Planarität in zyklischen Systemen sorgen („*improper dihedrals*“,  $E_{\text{impr}}$ , weiterhin Improperwinkel),
- der Van-der-Waals-Anziehungskräfte ( $E_{\text{vdW}}$ )
- der experimentellen Randbedingungen ( $E_{\text{exp}}$ )
- sowie einem Datenbank-Term für bevorzugte Peptidrückgrat- und Seitenkettenwinkel in Proteinen ( $E_{\text{RAMA}}$ ; Kuszewski *et al.*, 1996; Kap. III.4.4), der für die Verfeinerung der Struktur eingesetzt wurde,

zusammen.

Der jeweilige Einfluss der experimentellen Randbedingungen auf die Gesamtenergie kann über den Wichtungsfaktor  $w_{\text{exp}}$  für jeden Energieterm  $E_{\text{exp}}$  beeinflusst werden. Die in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Terme sind in Gleichung 2 aufgegliedert.

$$E_{\text{exp}} = E_{\text{NOE}} + E_{\text{dih}} + E_{\text{HBB}} \quad \text{Gl. 2}$$

Hierbei bezeichnet  $E_{\text{dih}}$  den Energieterm für die Diederwinkelkonformationen,  $E_{\text{HBB}}$  den für die Wasserstoffbrückenbeschränkungen und  $E_{\text{NOE}}$  den Energieterm für die Distanzbeschränkungen, der sich wie folgt berechnet (Gl. 3):

$$E_{\text{NOE}} = w_{\text{NOE}} \cdot \sum_{ij} (r_{ij} - r_{ij}^0)^2 \quad \text{Gl. 3}$$

$w_{\text{NOE}}$  bezeichnet den o. g. Wichtungsfaktor,  $r_{ij}$  ist der in der Simulation berechnete Abstand und  $r_{ij}^0$  die eingegebene Randbedingung. Für Abstände innerhalb der NOE-Distanzbeschränkungen wird der Energieterm über eine Kastenfunktion gleich Null gesetzt, so dass nur Verletzungen des Toleranzbereichs einen Einfluss auf die potentielle Energie der Struktur haben. Mit einem ähnlichen, sogenannten „*soft square well*“ Potential werden auch die Abstände für Wasserstoffbrücken ( $E_{\text{HBB}}$ ) eingeführt.

Der Term für die Diederwinkel aus TALOS ( $E_{\text{dih}}$ ) wird jedoch über ein trigonometrisches Potential kalkuliert (Gl. 4),

$$E_{\text{dih}} = \sum_{\text{diheds}} \sum_{i,j,m} \left\{ \begin{array}{l} w_{\varphi} (1 + \cos(n\varphi + \varphi_0)) \text{ für } n_i > 0 \\ w_{\varphi} (\varphi_i - \varphi_0)^2 \text{ für } n_i = 0 \end{array} \right\} \quad \text{Gl. 4}$$

mit  $w_{\varphi}$  als Wichtungsfaktor,  $n$  als Periodizität,  $m$  als Multiplizität (Standardwert = 1),  $\varphi$  als berechneter Torsionswinkel und  $\varphi_0$  als TALOS-Vorhersage des Winkels.

## 4.2 Erstellen der Koordinatendateien

Bei der Berechnung von Proteinstrukturen wird durch die Minimierung der Zielfunktion eine Energiehyperfläche nach einem globalen Minimum abgesucht (Kap. III.4.3). Um bei



den Rechnungen eine bevorzugte Ausrichtung gegen bestimmte, evtl. artifizielle konformationelle Nebenminima zu vermeiden, beruhten die Läufe auf einer Startstruktur mit ausgestreckter Konformation. Mit dem Protokoll `generate.inp` wurde hierfür eine .psf-Datei erzeugt, die alle wichtigen Parameter für die Minimierungsrechnungen im Kraftfeld enthält: die Sequenz des Peptids, die sequentielle Anordnung der Atome in den Aminosäuren mit zugehörigen Winkeln, die Zuordnung zu Atomtypen, die Atommassen und Ladungen sowie die Improperwinkel. Da pGolemi ein aminoterminales Prolin besitzt (Kap. III.2.1), musste das Parameterfile aus der Xplor-Bibliothek mit zusätzlichen Winkeln, Kraftkonstanten und Atomverbindungen versehen werden. Die zugehörigen Patches für `parallhdg_new.pro` sind im Folgenden mit Zeilennummern aufgeführt.

```

83  bond      CP  NH3      $kbon  1.473
139 angle     HA  CP  NH3    $kang  109.5
201 angle     CP  CP  NH3    $kang  103.2
209 angle     CT  NH3  CP     $kang  109.5
370 improper  N   CT  CT  CP  $kpla    0 0.0
378 improper  NH3 CT  CT  CP  $kpla    0 0.0

```

Basierend auf dieser Strukturdatei wurde dann eine .pdb-Datei mit den räumlichen Koordinaten der Atome und deren Konnektivität über das Xplor-Skript `generate_template.inp` erzeugt. Alle nicht im Anhang befindlichen Skripte wurden unverändert aus der Bibliothek der Xplor-NIH-Version 2.18 eingesetzt.

### 4.3 *Simulated-Annealing*-Läufe

*Simulated Annealing*, wörtlich “simulierte Abkühlung”, ist ein häufig verwendetes heuristisch-probabilistisches Verfahren zur Minimierung hochkomplexer Funktionen, deren numerische Lösung rechnerisch zu aufwendig wäre (Kirkpatrick *et al.*, 1983). Hierfür wird das System anfangs auf sehr hohe Temperaturen aufgeheizt und langsam kontrolliert abgekühlt. Durch die hohe Anfangsenergie des Systems werden lokale Minima überwunden und durch graduelle Abkühlung im thermodynamischen Gleichgewicht wird mit hoher Sicherheit eine Lösung nahe am globalen Minimum, was in diesem Fall der nativen Proteinstruktur entspricht, erhalten. Die für pGolemi

verwendeten Standardprotokolle aus der Xplor-Bibliothek enthalten beim Abkühlen zusätzlich eine hohe Wichtung der experimentellen Randbedingungen, um möglichst zielgerichtet in ein konformationelles Minimum zu steuern. In den anfänglichen Läufen (`sa_pgol.inp`; Kap. VI.3; Nilges *et al.*, 1991; Nilges, 1993) wird eine Minimierung nach dem *Conjugate Gradient*-Algorithmus (CG; Powell, 1977), gefolgt von einem kurzen Hochtemperatur-Molekulardynamiklauf bei 1000 K, durchgeführt. Durch diese Hochtemperatur-Phase soll ein möglichst freies und umfassendes Durchlaufen der Potentialfläche des Konformationsraumes ermöglicht werden; eine Steuerung in Richtung der experimentellen Randbedingungen wird durch eine konsekutive Erhöhung der zugehörigen Kraftkonstanten während dieser Phase erreicht. In der abschließenden Abkühlphase wird das System in 3000 Schritten langsam auf eine Temperatur von 100 K heruntergefahren und die Wichtung für die dihedralen Terme 200fach erhöht. Nach Erreichen der Zieltemperatur folgt eine finale CG-Minimierung mit größerer Skalierung des Energieterms für hydrophobe Wechselwirkungen ( $E_{\text{vaw}}$ ) in 200 Schritten, um eine weitere Optimierung der Struktur, vor allem bezüglich deren Packung, zu erreichen. Schließlich wird eine Schar von 200 berechneten Strukturen ausgeschrieben.

#### 4.4 Verfeinerung der Struktur

Durch das ursprüngliche `sa_pgol.inp`-Protokoll (Kap. VI.3) werden zwar alle Randbedingungen erfüllt, aber durch die kurze Abkühlungszeit entstehen eventuell thermodynamisch ungünstige Konformationen. Um die erhaltenen Winkel- und Konformationsgeometrien dahingehend zu optimieren, wurde bei pGolemi für alle 200 Strukturen ein Verfeinerungsschritt mit einem langsameren Abkühlungszyklus und weicheren Skalierungsfaktoren durchgeführt. Das verwendete Skript, `ref_pgol.inp` (Kap. VI.3) beginnt mit einer kurzen Hochtemperaturphase mit hoher Wichtung auf die experimentellen NOE-Randbedingungen und Bindungslängen. Die Abkühlphase wird mit 4000 Schritten langsamer durchgeführt und durch eine geringere Skalierung der hydrophoben Wechselwirkungen eine dichtere Packung der Atome ermöglicht. Da ein homonuklearer Datensatz bezüglich der Seitenkettenkonformationen meist besonders wenige Beschränkungen enthält, wurde für diesen Verfeinerungsschritt zusätzlich ein

effektives Potential (PMF, „*potential of mean force*“, Sippl, 1990) für  $\varphi$ -,  $\psi$ - und  $\chi_1$ -Winkel, das RAMA-Potential (Kuszewski *et al.*, 1996; Kuszewski *et al.*, 1997), eingeführt. Dieser Datenbankterm enthält Gauss-Potentiale für Torsionswinkel, welche aus hoch aufgelösten Kristallstrukturen abgeleitet wurden. Diese Potentiale sollen das konformationelle Sampling während der Minimierungsprotokolle in energetisch günstige und häufig populierte Regionen des Torsionsraumes führen. So können ungünstige dihedrale Konformationen vermieden und die Präzision der NMR-Strukturen erhöht werden (Kuszewski und Clore, 2000). Nach dieser Verfeinerung wurden die 200 Konformere über das Skript `accept.inp` nach Güte sortiert. Als Kriterien für gute Struktur-Ensembles gelten minimale Verletzungen der experimentellen Randbedingungen sowie geringe Energien. Mit den Schwellenwerten für NOE-Verletzungen kleiner als 0,25 Å und Winkelabweichungen kleiner als 5 ° konnte so ein Ensemble von 20 niederenergetischen Konformeren gewonnen werden.

#### 4.5 Analyse des Ensembles

Zur Evaluierung der Qualität der Strukturen wurde das Programm WHATIF (Vriend, 1990) verwendet. Hier können eine Vielzahl von Parametern wie Chiralität und Planarität der Atome, Bindungslängen, Packung der Aminosäuren, Seitenkettenkonformation und Verteilung der Torsionswinkel basierend auf dem Ramachandran-Diagramm (Ramachandran *et al.*, 1963) geprüft werden. Ausgehend von dieser umfassenden Analyse wurde eine endgültige Schar von zehn Konformeren ausgewählt. Mit Hilfe des Skriptes `average.inp` wurde daraus eine geometrische Durchschnittsstruktur berechnet. Die mittlere quadratische Standardabweichung (*root mean square deviation*, RMSD) zur geometrischen Durchschnittsstruktur wurde mit Hilfe des Programms YASARA (Krieger *et al.*, 2002; Krieger *et al.*, 2004) berechnet. Bei Überlagerungen der Strukturen für eine graphische Darstellung wurde zusätzlich der in YASARA implementierte Theseus-Algorithmus (Theobald und Wuttke, 2006) verwendet.

## 5. Homologiemodellierung mit Hilfe des Programmpaketes

### YASARA TwinSet

YASARA ist ein leistungsfähiges Programm für die Darstellung und Modifizierung von Makromolekülen (Krieger *et al.*, 2002; Krieger *et al.*, 2004). Bei den enthaltenen Funktionen für Molekülmodellierung und Molekulardynamiksimulationen können mehrere Kraftfelder angewendet werden, unter anderem auch das YASARA-eigene NOVA-Kraftfeld (Krieger *et al.*, 2002). Dieses „selbst-parameterisierte“ Kraftfeld basiert auf den parm94-Parametern von AMBER und auf einem Trainingsset von 50 hoch aufgelösten Kristallstrukturen und Strukturmodellen, an denen in Monte-Carlo-Schritten (MC) die Änderungen zur Verbesserung der herkömmlichen effektiven Potentiale (PMFs) getestet wurden. Vor allem für Verfeinerung von Modellen erweist sich dieses Kraftfeld besser geeignet als grobschrittige globale Algorithmen, welche für *ab-initio*-Proteinfaltung verwendet werden. Das NOVA-Kraftfeld wurde für eine Anfangsminimierung an jedem Homologiemodell verwendet (Kap. III.5.2).

#### 5.1. Erstellen einer Startstruktur für die Strukturberechnung von P11

Für die Strukturberechnung von P11 werden zusätzliche Parameter und Konstanten für chemische *Linker*gruppen und Isopeptidbindungen benötigt, welche gängige Kraftfelder nicht beinhalten. Auch das Xplor-Kraftfeld verfügt nicht über derartige Informationen in den Topologiebibliotheken. Daher können mit Xplor-Skripten ohne zusätzlichen Programmieraufwand weder .pdb- noch .psf-Dateien für P11 erzeugt werden. Mit dem YASARA Twinset wurde sowohl ein ausgestrecktes ( $\omega, \varphi, \psi = 180^\circ$ ) als auch ein gefaltetes Modell (basierend auf der Struktur von Mena EVH1, PDB Eintrag 1evh, Prehoda *et al.*, 1999) für das Peptid angefertigt (Kap. III.5.2). Mit der ausgestreckten Struktur kann über modifizierte Topologiedateien durch ein Standard-Skript (pdb2psf.inp) eine Strukturdatei für P11 erstellt werden. Das gefaltete Modell diene als Grundlage für die Homologiemodellierung (Kap. III.5.2). Für den Bereich  $C_{am}$ -Ac-Ahx

(Kap. III.2.1) wurden Standardbindungsängen und Winkel für die jeweiligen chemischen Gruppen verwendet.

## 5.2 Komparative Molekülmodellierung für P11, pGolemi und Mena EVH1

### 5.2.1 Ausgangskordinaten

In dieser Arbeit wurden vier Strukturmodelle durch komparative Molekülmodellierung erstellt: eine P11-Struktur, ein Komplex aus pGolemi und der Mena EVH1-Domäne, ein Komplex aus dem zweiten prolinreichen Repeat des ActA Proteins (PRII, Aminosäuren 334-346 des Swiss-Prot-Eintrags P33379) und der Mena EVH1 Domäne, sowie ein Komplex aus P11 und pGolemi. Alle Modelle fußen auf dem PDB-Eintrag 1evh (Prehoda *et al.*, 1999), der einen Komplex aus Mena EVH1-Domäne und einem Pentapeptid der Sequenz FP<sub>4</sub> enthält. Für pGolemi wurde die mit Xplor-NIH berechnete geometrische Durchschnittsstruktur der minimierten Strukturschar eingesetzt (Kap. III.4.5). Für P11 wurden die Reste 13–26 sowie 70–81, entsprechend den Faltblättern  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_6$  und einer zugehörigen Schleifenregion aus dem Swiss-Prot-Eintrag Q03173 (für Mena), verwendet. Alle Modelle wurden zunächst 100 Schritten einer *in vacuo-steepest descent*-Minimierung und anschließendem 40 ps-SA-Lauf im NOVA-Kraftfeld (Kap. III.5) unterzogen, um eventuell bei der Modellierung entstandene konformationelle Spannungen und Verletzungen der Van-der-Waals-Radii zu eliminieren.

### 5.2.2 Molekulardynamikläufe in explizitem Lösungsmittel

Für die Ligandenkomplexe folgte ein Molekulardynamiklauf über bis zu 1,5 ns im YAMBER2-Kraftfeld in Wasser mit physiologischem Salzgehalt. Dieses Kraftfeld ist - ähnlich wie NOVA – eine Ableitung des AMBER99-Kraftfeldes (Wang *et al.*, 2000), welches mit MC-Schritten im Parameterraum an einem Trainingsset optimiert wurde (Krieger *et al.*, 2004). Als Trainingsset wurden für YAMBER2 jedoch ganze Einheitszellen von Kristallstrukturen, einschließlich der Wassermoleküle, Gegenionen und Wasserstoffe unter Berücksichtigung des pHs verwendet. Das YAMBER2-Kraftfeld ist auf Grund des eingesetzten Trainingssets sehr gut für Simulationen in Wasser geeignet, da viele Kraftfeldparameter an Proteinen mit Lösungsmittelumgebung optimiert wurden. Für den

MD-Lauf wurde das YASARA-Skript `md_run.mcr` mit entsprechend verändertem Kraftfeld verwendet. Die Integrationsschritte betrugen für intramolekulare Wechselwirkungen 1,25 fs; für intermolekulare Wechselwirkungen 2,5 fs. Vor dem eigentlichen Produktionslauf wurden die Modelle solvatisiert und nach einer empirischen pK<sub>A</sub>-Vorhersage (Krieger *et al.*, 2006) entsprechende Ladungen mit Gegenionen (Na<sup>+</sup> oder Cl<sup>-</sup>) ausgeglichen. Um hier einen optimalen Kontakt der Proteinseitenketten mit dem Lösungsmittel herzustellen, wurde ein 5 ps-Lauf und eine kurze SA-Minimierung mit fixiertem Proteinrückgrat durchgeführt. Weitreichende Elektrostatikwechselwirkungen wurden über *Particle-Mesh*-Ewald-Summation berechnet (Ausschlussgrenze 7,9 Å, Darden *et al.*, 1993, Essmann *et al.*, 1995). Die Trajektorien wurden alle 7,5 ps ausgeschrieben und analysiert.

### 5.2.3 Verfeinerung der erhaltenen Komplexe

Schließlich wurden alle vier Strukturmodelle, P11 und die drei Komplexe, nach dem MD-Lauf (Kap. III.5.2.2) über eine finale SA-Minimierung mit dem Konvergenzkriterium von stabiler potentieller Energie innerhalb von fünf Integrationsschritten (entspricht 1 ps) verfeinert.

## 5.3 Analyse der Trajektorien und Strukturmodelle

Die erhaltenen Trajektorien wurden über das Skript `md_analyze.mcr` in YASARA analysiert. Für jeden Simulationsschritt wurden die potentielle Energie und die Abweichungen der C<sub>α</sub>- und übrigen Atome zur Startstruktur berechnet (Kap. VI.4). Nach Äquilibration der Systeme (etwa 1 ns) wurden für charakteristische Atompaare des Komplexes Abstandsgraphen erstellt (Kap. VI.4). Für die Hauptpopulation wurden dann weitere Kontakte zwischen dem Liganden und Mena-EVH1 bzw. P11 sowie mögliche intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen untersucht. Ein repräsentativer Simulationsschritt der Population wurde schließlich der finalen Minimierung unterzogen (Kap. III.5.2.3). Die fertigen Strukturmodelle wurden dann weiter auf Normalität der Bindungen und Bindungswinkel, potentielle Energie und Torsionswinkel untersucht.

## IV. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 1. Strukturbestimmung von pGolemi

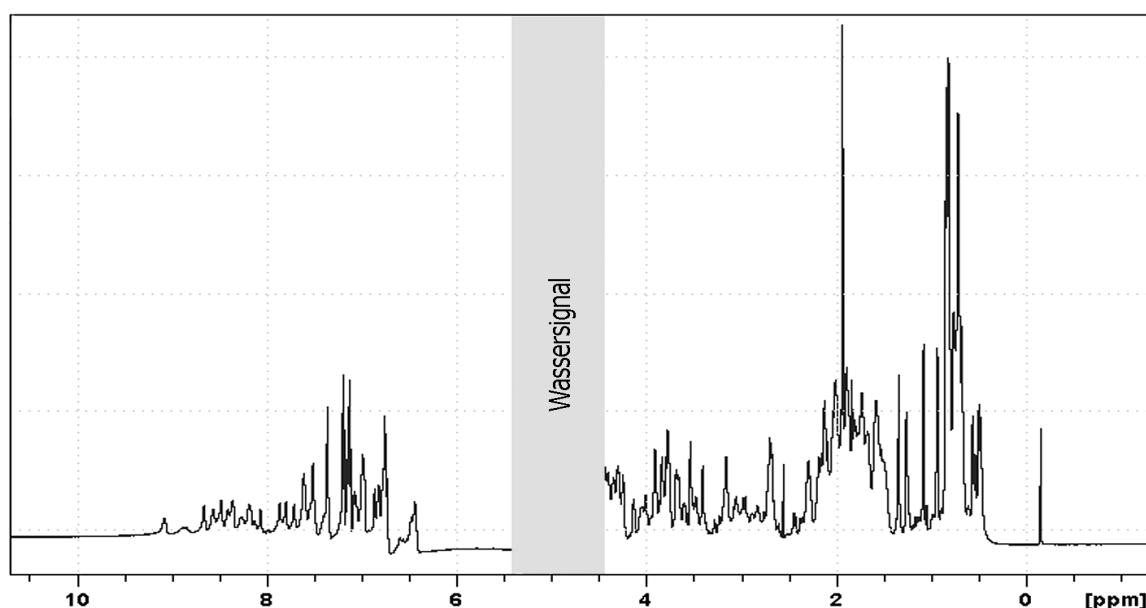
Zur Gewinnung der experimentellen Randbedingungen für die Strukturbestimmung sind qualitativ hochwertige und interpretierbare Spektren essentiell. Ausschlaggebend für solche Spektren ist neben Spektrometern mit möglichst hoher Feldstärke eine lösliche und strukturierte Probe, die in hoher Konzentration nicht aggregiert und über den Messzeitraum stabil bleibt.

#### 1.1 Aufnahme und Zuordnung der Spektren für pGolemi

Um zu prüfen, ob das synthetisierte Peptid bei den gewählten Pufferbedingungen in Lösung eine geordnete Tertiärstruktur aufweist und für die Strukturaufklärung zugänglich ist, wurde zunächst ein 1D- $^1\text{H}$ -Spektrum aufgenommen. Bereits mit diesem einfachen Spektrum können wichtige Erkenntnisse über die Probe gewonnen werden.

So zeigt sich eine gute Dispersion der Signale über eine Reichweite von ca. 9 ppm, was ein eindeutiges Indiz für das Vorliegen einer ausgeprägten Tertiärstruktur ist (Abb. IV.1). Die Hochfeldverschiebung der Methylprotonenresonanzen zwischen 0 und 1 ppm weist auf eine Veränderung der chemischen Umgebung der zugehörigen Atome hin, welche meist durch die Wechselwirkung mit hydrophoben Resten zustande kommt und ebenso die Existenz von strukturierten Bereichen anzeigt. Im Bereich von 5–6 ppm sind keine tieffeldverschobenen  $\text{H}_\alpha$ -Resonanzen zu sehen, was auf eine Faltung ohne  $\beta$ -Faltblattstrukturen hindeutet. Als Hinweis für das Vorliegen einer  $\alpha$ -helikalen Struktur ist eine relativ begrenzte Dispersion der Amidprotonen zu werten (Wishart *et al.*, 1991).

Um möglichst nahe an physiologischen Bedingungen zu bleiben, wurde die Probe bei einem pH von 7.0 gelöst. Beim gewählten pH war die Intensität der Amidresonanzen gut, so dass auf eine Optimierung des pH-Wertes verzichtet wurde. Auf Grund der guten Qualität des 1D-Spektrums konnte umgehend mit der Aufnahme der zweidimensionalen Spektren begonnen werden.

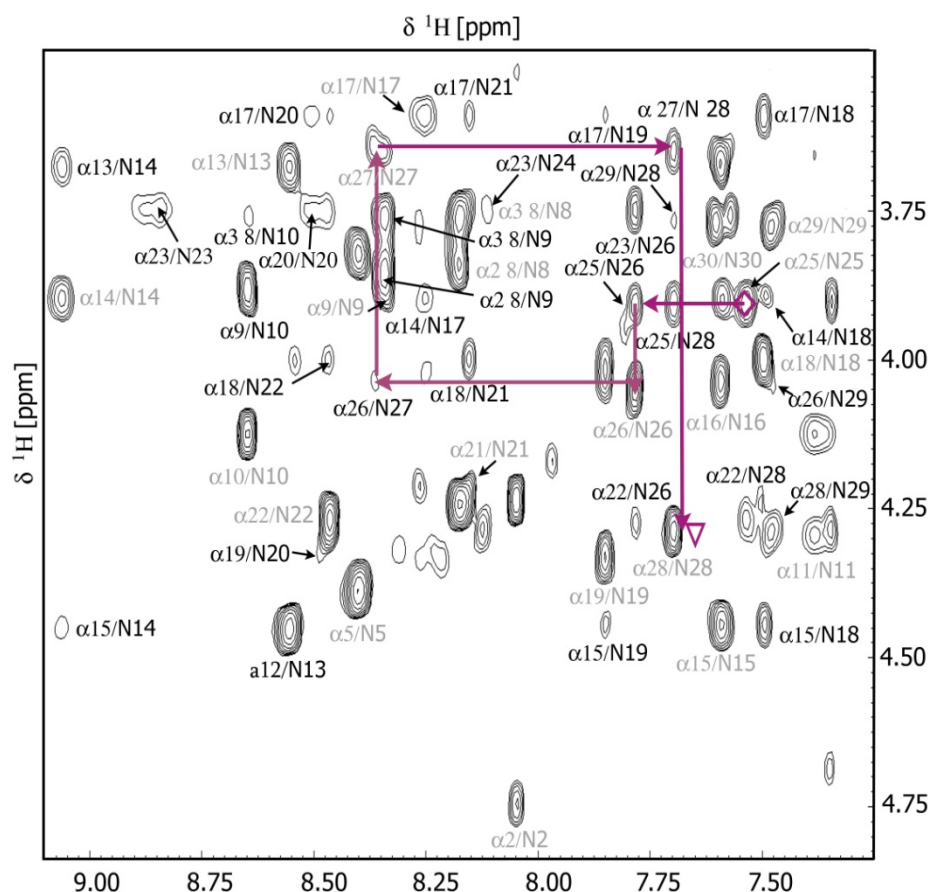


**Abb. IV.1:** 1D- $^1\text{H}$ -Spektrum von pGolemi. Messbedingungen: 1 mM pGolemi in 45 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0, 10%  $\text{D}_2\text{O}$  (v/v), bei 16,4 T und 300 K (Kap. III.3.3).

Die für die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur nötige Zuordnung der Resonanzsignale erfolgte über drei Arten von homonuklearen Spektren: COSY, TOCSY und NOESY (Kap. III.3.5.1). Durch die Überlagerung der TOCSY- und COSY-Spektren konnten nicht alle Resonanzen eindeutig den Spinsystemen zugeordnet werden. Daher wurde auch schon für den Zuordnungsprozess das NOESY-Spektrum hinzugezogen, vor Allem, weil einige Spinsysteme, wie zum Beispiel Glu14, Ile17 und Leu23, im TOCSY-Spektrum nicht sichtbar waren und nur über Zuhilfenahme des NOESY-Spektrums identifiziert werden konnten. Mit dieser Strategie konnten die Resonanzsignale der Rückgratprotonen für pGolemi vollständig zugeordnet werden.

Die ausgewertete *Fingerprint*-Region aus dem NOESY-Spektrum für pGolemi ist in Abb. IV.2 gezeigt. Ebenso ist das Prinzip des „*Chain Tracing*“ (Kap. III.3.5.1) schematisch an den Aminosäureresten 25 bis 28 dargestellt. Neben den Resonanzen, die zur jeweiligen Aminosäuren gehören, treten im NOESY-Spektrum auch die Signale von räumlich benachbarten Protonen, also im Idealfall von der vorhergehenden und nachfolgenden Aminosäure, bei den zugehörigen Frequenzen auf. Man kann sich folglich von einem Spinsystem zum nächsten bewegen, indem man zunächst vertikal ein Kreuzsignal zu den



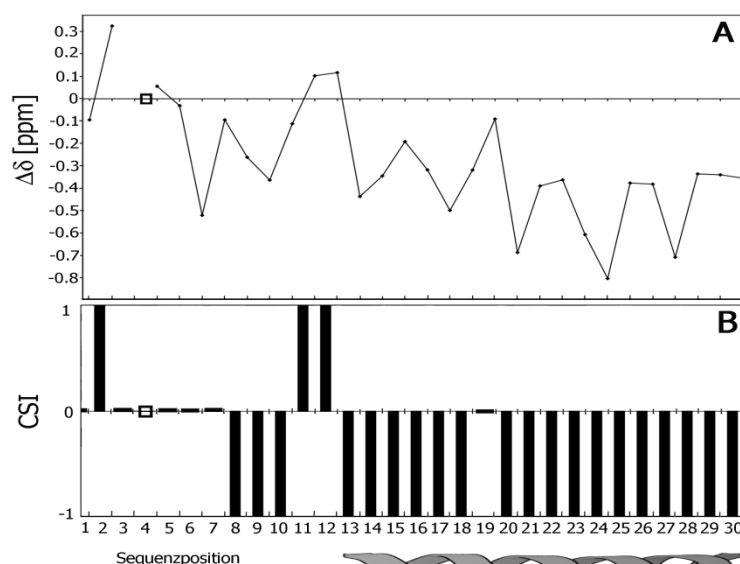


**Abb. IV.2:** „Fingerprint-Region“ aus dem NOESY-Spektrum für pGolemi.

Sichtbar sind jeweils die Kreuzresonanzen zwischen  $H_{\alpha}$  ( $\alpha$ ) und  $H_N$ -Protonen ( $N$ ). Intrareiduale Signale sind in grau gezeigt. Exemplarisch ist mit Pfeilen das *Chain Tracing* zwischen den Resten 25 und 28 dargestellt. Auf die übrigen Pfeile wurden zur besseren Übersicht verzichtet.

Rückgratprotonen ( $H_{\alpha}$  oder  $H_N$ ) einer benachbarten Aminosäure sucht und sich dann horizontal zum Spinsystem dieser Aminosäure bewegt. Das „*Chain Tracing*“ funktioniert jedoch nur lückenlos, wenn die beteiligten Reste auch jeweils ein  $H_N$ -Proton besitzen. Der hohe Prolinanteil der aminoterminalen Reste (Abb. I.6 und Tab. III.1) in pGolemi erlaubte diese Strategie daher nur für die Aminosäurereste ab Valin 13. Durch die Präsenz von starken NOEs vom Typ  $d_{NM}(i,i+1)$  für den Hauptteil der Aminosäuren außer Prolin im Spektrum, konnten diese Resonanzen jedoch komplett zugeordnet werden (Tab. IV.1). Die Proline wurden manuell über  $H_{\alpha}$ - und Seitenkettenkreuzsignale zugeordnet. Insgesamt wurden 373 Distanzbeschränkungen aus dem NOESY-Spektrum gewonnen. Wie schon im 1D-Spektrum vermutet, konnte durch die Anwesenheit von NOEs des Typs  $d_{\alpha N}(i,i+3)$  sowie  $d_{\alpha N}(i,i+4)$  für die Reste 14–27 eine helikale Konformation dieser

Aminosäuren bestätigt werden. Wegen der hohen Signaldichte im Bereich der Methylprotonen konnte jedoch nur eine begrenzte Zahl der ebenso indikativen NOES vom Typ  $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$  zugeordnet werden. Für eine komplette Übersicht der NOE-Konnektivität sei vorgreifend auf Abb. IV.5.B verwiesen.



**Abb. IV.3:** Graphische Darstellung der Sekundärstrukturanalyse nach Wishart wie unter Kap. III.3.5.4 beschrieben. **A)** Auftragung der sekundären chemischen Verschiebung ( $\delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{RC}}$ ). **B)** Auftragung des chemischen Verschiebungsindex (CSI). Für zugeordnete Bereiche ist schematisch die Art der Sekundärstruktur unter der Sequenzposition dargestellt. Der Rest Pro4 mit fehlender  $\text{H}_\alpha$ -Zuordnung ist durch ein  $\square$  gekennzeichnet.

## 1.2 Analyse der Sekundärstruktur nach Wishart

Die chemische Verschiebung von Protonen ist stark abhängig von deren elektrischer Umgebung und von Beeinflussung durch räumlich benachbarte Gruppen. Wishart konnte zeigen, dass vor Allem die  $\text{H}_\alpha$ -Protonen sehr empfindlich auf eine Anordnung in Sekundärstrukturelementen reagieren (Wishart *et al.*, 1991): deren Resonanzfrequenzen sind bei  $\alpha$ -Helices meist hochfeldverschoben, während bei Vorliegen einer  $\beta$ -Faltblattstruktur eine Tieffeldverschiebung zu beobachten ist.

Diese Regelmäßigkeit kann man sich zu Nutze machen, um basierend auf der chemischen Verschiebung Sekundärstrukturelemente anhand ihres chemischen Verschiebungsindex (CSI) zu identifizieren (Kap. III.3.5.4). Für pGolemi ergibt sich daraus, in Übereinstimmung mit dem Konnektivitätsmuster der NOEs (Abb. IV.5.B), eindeutig eine helikale Anordnung für die Aminosäurereste von Val13 bis Val30, während sich für die anderen

Reste keine definierte Sekundärstruktur zuordnen ließ. Diese Vorhersage konnte in späteren Strukturrechnungen (Kap. IV.1.5.1) bestätigt werden. Eine Auftragung der sekundären chemischen Verschiebungen sowie des CSIs ist in Abb. IV.3. dargestellt.

### 1.3 Identifizierung von Wasserstoffbrückenbindungen

Zur Identifizierung langsam austauschender Amidprotonen wurde eine Probe von pGolemi lyophilisiert (Kap. III.3.2) und sofort nach dem Lösen der Probe ein  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY in 100 %  $\text{D}_2\text{O}$  aufgenommen (Kap. III.3.3). Im Spektrum konnten Resonanzen von zwei Amidprotonen identifiziert werden,  $\text{H}_\text{N}$  11 und  $\text{H}_\text{N}$  17, die potentielle Wasserstoffbrückendonoren darstellen. Im weiteren Verlauf der Strukturberechnung konnten deren jeweilige Akzeptoren identifiziert und die Wasserstoffbrücken verifiziert werden (Kap. IV.1.6.1). Die Abwesenheit weiterer Amidprotonensignale im  $\text{D}_2\text{O}$ -Spektrum deutet auf einen Austausch der Helix mit der Umgebung hin und daher auf eine gewisse Dynamik. Trotzdem gibt es im Spektrum immer noch eine sehr hohe Zahl von intraresidualen Aromatenresonanzen wie  $\text{H}_\delta$  20/ $\text{H}_\epsilon$  20 oder  $\text{H}_\alpha$  19/ $\text{H}_\delta$  19, die offensichtlich vor dem Austausch geschützt sind und auch von interresidualen Resonanzen der Seitenketten zu den hydrophoben Resten wie  $\text{H}_{\gamma 2}$  17/ $\text{H}_\epsilon$  18 oder  $\text{H}_\beta$  27/ $\text{H}_\delta$  26. Daher kann von einem strukturierten, stabilen hydrophoben Kern ausgegangen werden.

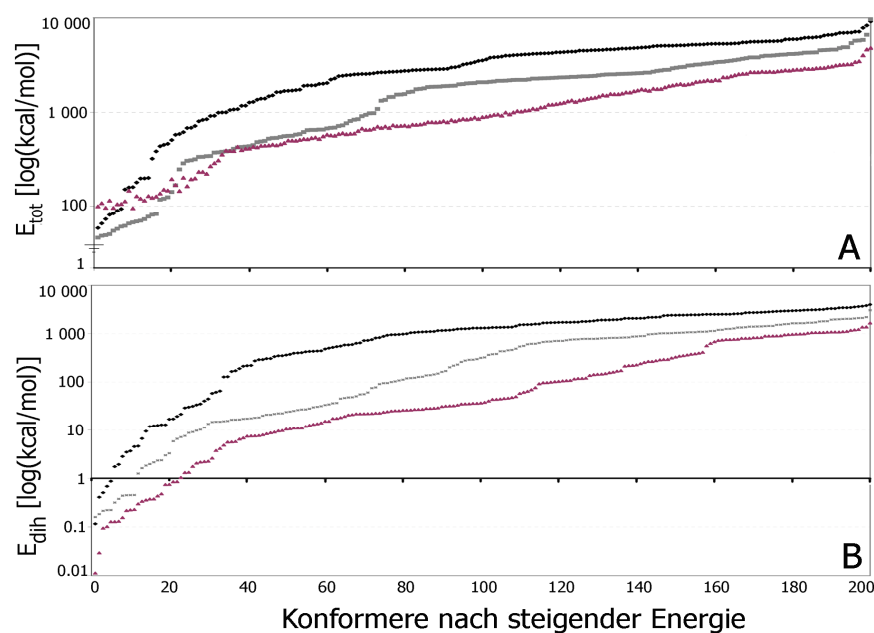
### 1.4 Vorhersage der dihedralen Winkel mit Hilfe von TALOS

Mit Hilfe von TALOS (Cornilescu *et al.*, 1999) wurden Vorhersagen für die Torsionswinkel des gesamten Peptids erstellt. Die Methode nutzt die Korrelation zwischen chemischer Verschiebung und der Sekundärstruktur, welche unter Anderem auch von den Diederwinkeln der Peptidbindung bestimmt wird (Kap. III.3.5.4). Durch die Verwendung von Triplets von chemischen Verschiebungen bei der Suche in der integrierten Datenbank wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, die richtige Winkelkombination vorherzusagen. Da auf Grund des homonuklearen Datensatzes nur eine begrenzte Zahl von Informationen erhältlich und folglich eine höhere Fehlerwahr-

scheinlichkeit zu erwarten war, wurden für die Strukturberechnung nur Vorhersagen mit kleiner Standardabweichung verwendet, also für die Reste Phe2, Pro4, Thr5, Pro6 und für die Reste 9–29. Obwohl die sekundären chemischen Verschiebungen durch die geringere Dispersion der Protonenresonanzen im Vergleich zu den Heterokernen  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  wesentlich kleiner sind, konnte auch hier eine hinreichende Vorhersage für die Torsionswinkel in pGolemi getroffen werden.

### 1.5. Berechnung der Tertiärstruktur mit Xplor-NIH

Mit den gewonnenen Randbedingungen aus Kap. IV.1.1, IV.1.2 und IV.1.4 konnten Strukturberechnungen durchgeführt werden. Die 373 NOE-Distanzbeschränkungen wurden in intraresiduale, sequentielle ( $i, i+1$ ), mittelweite ( $<i, i+4$ ) und weitreichende NOEs ( $>i, i+4$ ) aufgeteilt (Abb. IV.5.A). Zu Beginn der Rechnungen wurde auf das Einbeziehen der intraresidualen Beschränkungen verzichtet. Diese wurden erst am Ende zu Verbesserung der Struktur verwendet. Da erste Proberechnungen die bereits über die Wishart-Analyse (Kap. IV.1.4) und die NOE-Konnektivität (Kap. IV.1.1; Abb. IV.5.B) vermutete Helix bestätigten, wurden für die weiteren Rechnungen zusätzlich Distanzbeschränkungen für die Reste 13 und 30 eingeführt. Es wurden je zwei Beschränkungen für die in  $\alpha$ -Helices typischen Wasserstoffbrücken zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff der Aminosäure  $i$  und dem Amidproton der Aminosäure der nächsten Windung ( $i+4$ ) gesetzt. In einem dreistufigen *Simulated Annealing*-Verfahren (Kap. III.4.3 und III.4.4) wurde zunächst aus einer ausgestreckten Konformation eine Strukturenschar von 200 Konformeren generiert und diese anschließend komplett einem Verfeinerungsschritt unterzogen, bei dem das RAMA-Datenbankpotential zum Einsatz kam; ein effektives Potential („*potential of mean force*“, PMF), das Strukturen in bevorzugte Torsionswinkelbereiche führen soll (Kuszewski *et al.*, 1997; Kuszewski und Clore, 2000; Kap. III.4.4). An der Energieverteilung der Konformerenschar kann der Effekt des RAMA-Potentials eindeutig nachvollzogen werden (Abb. IV.4).



**Abb. IV.4:** Energieprofil der erhaltenen Strukturscharen bei Verwendung unterschiedlicher Protokolle. **A)** Gesamtenergie **B)** Term für dihedrale Beschränkungen ( $E_{\text{dih}}$ ). Dargestellt ist in schwarz der Graph für *sa.inp*, in grau für *ref.inp* und in magenta für *ref.inp* mit RAMA-Term (Kap. III.4.3 und III.4.4).

Während die schnellen Abkühlungsschritte des *sa.inp*-Protokolls (schwarze Kurve; Kap. VI.3) Konformere mit relativ hohen Gesamtenergien produzierten, sank das Energieprofil für das langsamere *ref.inp*-Protokoll (graue Kurve; Kap. VI.3) deutlich. Bei zusätzlicher Verwendung des RAMA-Potentials in diesem Protokoll konnte nochmals eine große Verringerung der Energie beobachtet werden. Eine kleinere Energie des Systems entspricht meist einer geringeren Verletzung der Randbedingungen. Die Effektivität des PMFs wird vor Allem bei der Auftragung des Energieterms für die dihedralen Winkel ( $E_{\text{dih}}$ ) deutlich (Abb. IV.4.B): durch den zusätzlich eingeführten „Bestrafungs“-Term für die Torsionswinkel verringert sich das Energieprofil für diese Winkel bedeutend.

Zusammenfassend wird ersichtlich, dass die Konformere von pGolemi signifikant von dem eingesetzten Datenbankterm profitieren. Ähnliches wurde auch schon für andere Datensätze mit wenigen Randbedingungen für dihedrale Konformationen berichtet (Kuszewski *et al.*, 1997; Kuszewski und Clore, 2000).

Die erhaltene verfeinerte Strukturschar wurde nach niedriger Energie und möglichst kleinen Verletzungen der experimentellen Randbedingungen sortiert (Kap. III.4.4) und daraus ein finales Ensemble zusammengestellt (Abb. IV.5.A). Diese Schar von 10 Konformeren weist keine systematische Verletzung der NOE-Distanzbeschränkungen über 0,25 Å sowie keine Verletzung der über TALOS gewonnenen dihedralen Beschränkungen über 5 ° auf. Die Atomkoordinaten der 10 akzeptierten Konformere wurden in der *Protein Data Bank* (PDB) unter dem Zugangscode 2k76 hinterlegt. Eine detaillierte Aufstellung der Charakteristika des Ensembles ist in Tabelle IV.1 zu finden. Die gute Konvergenz der Schar zeigt sich neben der geringen Standardabweichung der durchschnittlichen Energie auch an dem geringen Wert der mittleren quadratischen Standardabweichung (RMSD-Wert) von 0,525 Å für das komplette Ensemble zu einer mit Xplor-NIH berechneten geometrischen Durchschnittsstruktur (Kap. III.4.4). Bei ausschließlicher Überlagerung der Reste der  $\alpha$ -Helix verringert sich dieser Wert sogar auf 0,141 Å. Interessanterweise ist der RMSD-Wert für die Überlagerung der aminoterminalen Teils von pGolemi (Reste 2–8) mit 0,181 Å ebenso sehr klein, obwohl für diesen Bereich nur wenige interresiduale NOEs zu finden waren (Abb. IV.5.B) und die TALOS-Vorhersage nicht für alle Reste verwendet werden konnte. Offensichtlich gleicht hier die Anzahl der verwendeten intraresidualen und der weitreichenden Distanzbeschränkungen die geringe Zahl von interresidualen Beschränkungen aus und ermöglicht die Berechnung einer wohldefinierten Strukturschar.

Die Struktur von pGolemi besteht aus einer langen  $\alpha$ -Helix, einem *Turn*-Bereich und einem aminoterminalen Bereich, dem keine geordnete Sekundärstruktur zugewiesen werden kann. Die erhaltenen Werte, also 60 % Helixanteil, 13 % Turn und 26,7 % Anteil ohne geregelte Sekundärstruktur, entsprechen den experimentell berechneten Werten von 43 % bzw. 49 %  $\alpha$ -Helixanteil für pGolemi (Golemi-Kotra *et al.*, 2004; Holtzman *et al.*, 2007).

**Tab. IV.1:** Zusammenfassung der wichtigsten Parameter für die Strukturberechnung von pGolemi. Die Mittelwerte beziehen sich auf die ausgewählten 10 Konformere;  $\sigma$  bezeichnet die jeweilige Standardabweichung.

Verwendete experimentelle Randbedingungen		
<u>Abstandsbeschränkungen aus NOESY-Daten</u>		
Total		373
Intraresidual		203
Interresidual		170
	Sequentiell ( $i, i+1$ )	95
	Mittelweit ( $<(i, i+4)$ )	63
	Weitreichend ( $>(i, i+4)$ )	12
<u>Dihedrale Beschränkungen</u>		50
<u>Beschränkungen aus Wasserstoffbrücken</u>		26
STATISTIK DER AUSGEWÄHLTEN STRUKTURENSCHAR		
Durchschnittsenergien	(kcal mol <sup>-1</sup> )	[ $\sigma$ ]
Bindungsstreckung	3,108	0,32
Winkelbiegung	36,982	2,58
Dihedral	-349,980	13,62
Van-der-Waals	10,468	2,74
Total	-288,880	15,74
Standardabweichung zu idealen Abständen	(Å)	[ $\sigma$ ]
Bindungslängen	$2,28 \cdot 10^{-04}$	$6,78 \cdot 10^{-05}$
Abstandsbeschränkungen	$2,32 \cdot 10^{-03}$	$3,13 \cdot 10^{-04}$
Standardabweichung zu idealen Winkeln	(°)	[ $\sigma$ ]
Bindungswinkel	0,522	0,02
Improperwinkel	0,341	0,03
Diederwinkelbeschränkungen	0,593	0,88
Paarweiser Schweratom-RMSD-Wert zur Durchschnittsstruktur	(Å)	
Reste 1 - 30	0,525	
$\alpha$ -Helix	0,141	
Reste 2 - 8 (PPII-Teil)	0,181	
Durchschnittlicher Sekundärstrukturgehalt	(%)	
$\alpha$ -Helix	60	
Schleife	13,3	
Ungeordnet	26,7	

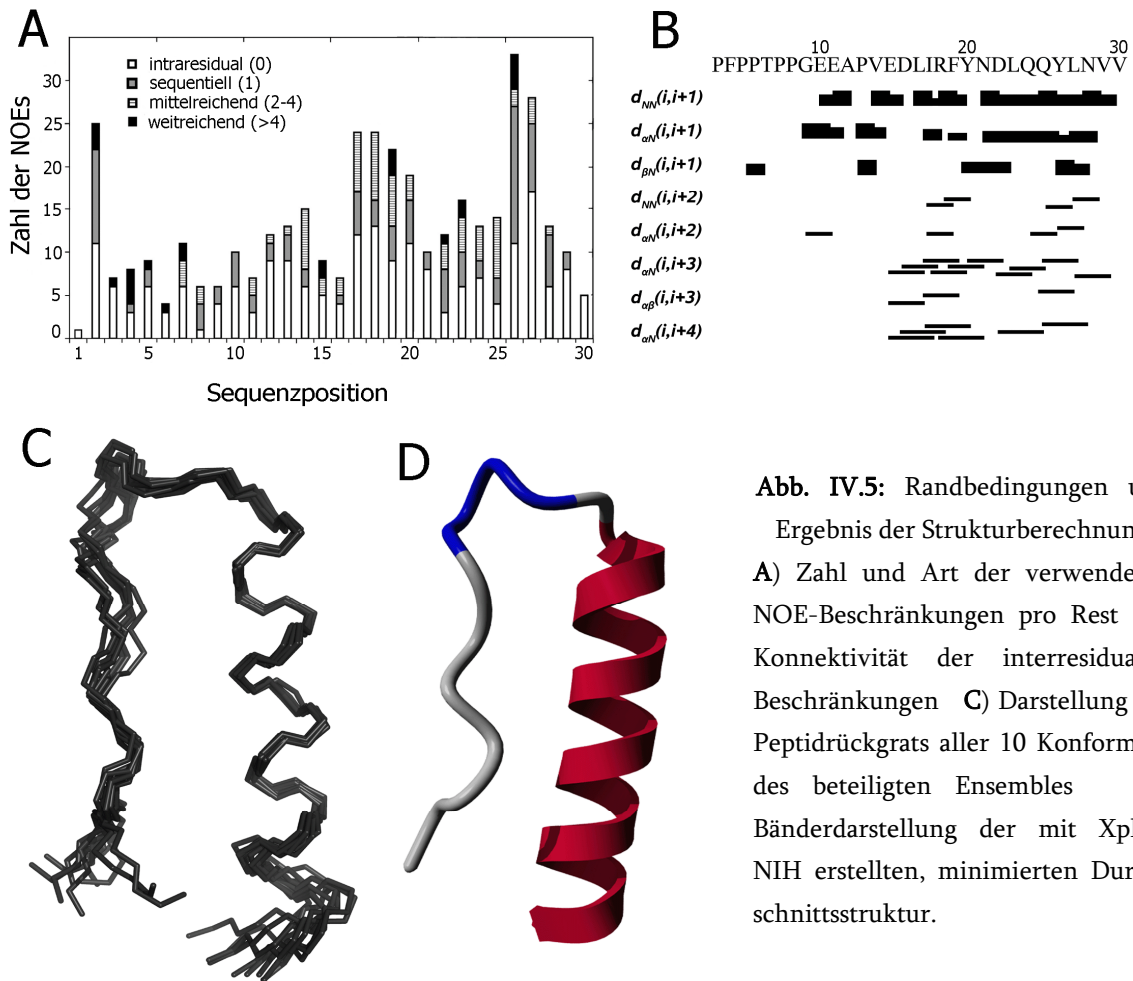
## 1.6. Charakterisierung der erhaltenen Strukturenschar

Mit einer durchschnittlichen Menge von 15 Beschränkungen pro Rest aus NOE-Daten, Winkelvorschlägen und Wasserstoffbrücken (vgl. Tab. IV.1 und Abb. IV.5.A) wurde ein energetisch konvergentes Strukturbündel berechnet. Die erhaltene räumliche Struktur soll im Folgenden näher diskutiert werden.

### 1.6.1 pGolemi ist ein monomeres Haarnadel-Peptid

pGolemi ist ein synthetisches Peptid, das durch spezifische Aminosäureaustausche aus dem *avian pancreatic peptide* (aPP), einem Peptidhormon aus dem Pankreas von Truthähnen (Kimmel *et al.*, 1975), gewonnen wurde. Trotz dieser Mutationen bleibt jedoch die globale Struktur dieses Hormons erhalten (Abb. IV.5.C und D): auch pGolemi besteht aus einem prolinreichen, ausgestreckten Aminoterminus (Reste 1-8 in pGolemi-Nomenklatur), einem klassischen  $\beta$ -Turn (Reste 9-12) sowie einer langen  $\alpha$ -Helix (Reste 13-30). Die Helix ist jeweils durch Wasserstoffbrücken stabilisiert, von denen eine, ausgehend von H<sub>N</sub>17, im D<sub>2</sub>O-Spektrum identifiziert werden konnte (Kap. IV.1.3). Die zweite gefundene Kreuzresonanz korrespondiert zu der Wasserstoffbrücke der Turn-Region zwischen der Aminogruppe von Ala11 und dem Carbonylsauerstoff des Gly8, wie sich durch Analyse der finalen Strukturenschar herausgestellt hat. Der Schweratom-RMSD zwischen pGolemi und dem Ursprungspeptid aPP beträgt nur 1,12 Å; bei Überlagerung der Helix sogar nur 0,61 Å. Im Gegensatz zu aPP und einigen anderen von diesem Peptid abgeleiteten Miniaturproteinen, welche schon in mikromolarer Konzentration zu Dimeren assoziieren (Glover *et al.*, 1983; Jurt *et al.*, 2006; Rutledge *et al.*, 2003; Cobos *et al.*, 2004), liegt pGolemi sogar noch unter den gewählten Messbedingungen in hoher Konzentration (1 mM) als Monomer vor. Es konnten im NOESY-Spektrum keine intermolekularen NOEs zwischen den Resten des hydrophoben Kerns, welche in aPP für die Dimerisierung zuständig sind, also Tyr7 und Pro20/Tyr21, gefunden werden. Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass die Aufhebung der Dimerisierung mit der Mutation des Restes Tyr7 aus aPP zu Pro6 aus pGolemi zusammenhängt (Hodges und Schepartz, 2007). Eine in dieser Studie durch Ultrazentrifugationsmessungen untersuchte Tyr7Ala-Mutante lag bis in hohen





**Abb. IV.5:** Randbedingungen und Ergebnis der Strukturberechnung.

A) Zahl und Art der verwendeten NOE-Beschränkungen pro Rest B) Konnektivität der interresidualen Beschränkungen C) Darstellung des Peptidrückgrats aller 10 Konformere des beteiligten Ensembles D) Bänderdarstellung der mit Xplor-NIH erstellten, minimierten Durchschnittsstruktur.

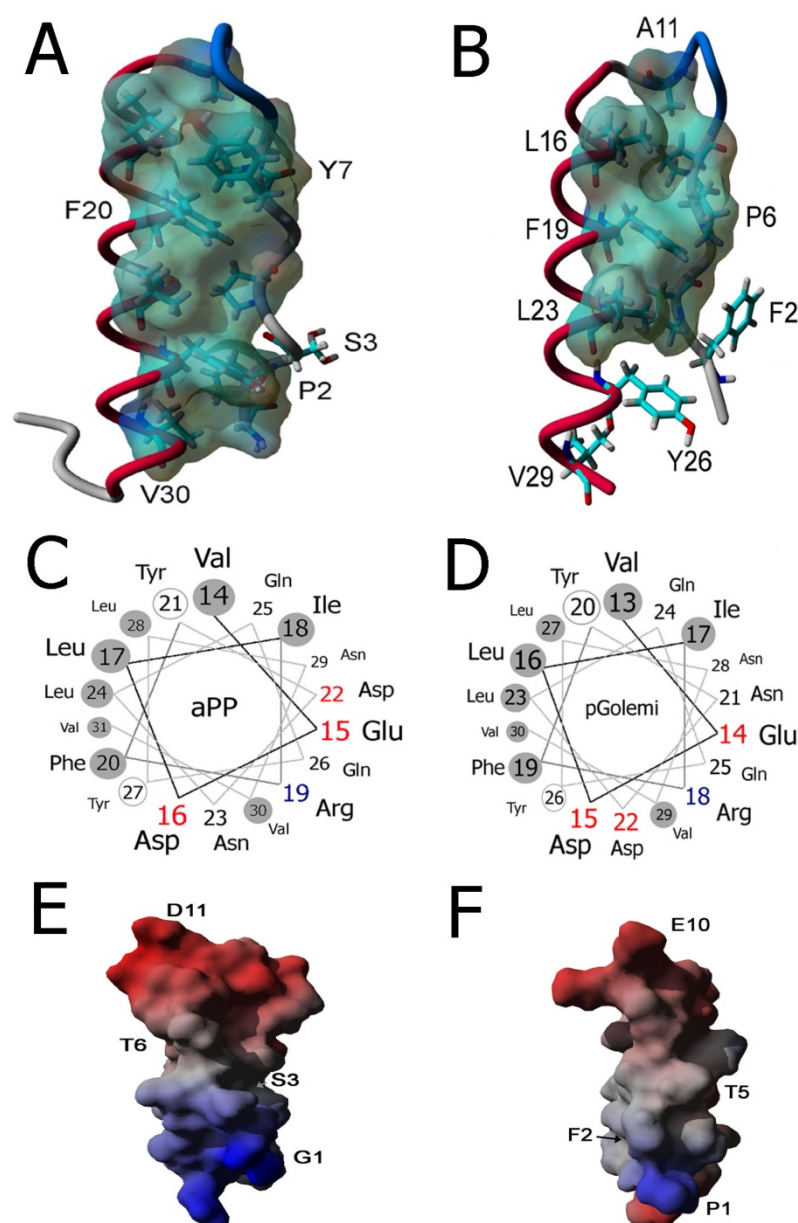
Konzentrationen als Monomer vor. Allerdings wurde nur das Aggregationsverhalten von verschiedenen Alanin-Mutanten für aPP, nicht für pGolemi, untersucht.

Bei Betrachtung des hydrophoben Kerns der beiden Peptide wird auch hier ein großer Unterschied sichtbar (Abb. IV.6.A und B). Das Hormon aPP bildet den für pankreatische Peptide typischen hydrophoben Kern zwischen den Resten Pro1 und Tyr26, Pro4 und Leu23, Tyr6 und Phe19 sowie Pro7 und Leu17 (pGolemi-Nomenklatur) mit einem zusätzlichen Kontakt zwischen Pro1 und Val29 aus, der für die hohe Stabilität dieses Haarnadel-Miniaturproteins sorgt. Diese Kernregion ist in der pGolemi-Struktur verändert: die Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Resten der amphipathischen Helix und dem Prolin-Teil werden nicht bis zu Pro1 fortgesetzt, sondern ab Rest Pro3 dreht sich der aminoterminaler Teil nach außen zum Lösungsmittel hin (Abb. IV.6.B) Da die Aminosäurezusammensetzung und auch die Ladung der beiden Helices zu 95 % gleich ist (Abb. IV.6.C und D) müssen die Gründe für diese Veränderung

an der veränderten Peptidlänge von pGolemi liegen: einerseits in der um eine Windung gekürzten Helix am Carboxyterminus, andererseits an dem fehlenden Glycin am Aminoterminal. Durch die Kürzung entfallen vier Wasserstoffbrückenbindungen, welche die Helix stabilisieren und diese optimal für die Wechselwirkung mit dem Polyprolineteil positionieren. In aPP kann Gly1 zwar keine Seitenketteninteraktion mit der Helix eingehen, es bestehen aber dennoch Kontakte zwischen dessen  $C_{\alpha}$  und der  $\gamma$ -Methylgruppe des Val30 (Abb. IV.6.A). In pGolemi sind beide Wechselwirkungen nicht mehr vorhanden – neben einer destabilisierten letzten Helixwindung fehlt also auch der Rückgratkontakt der ersten Aminosäure, welcher die Ausrichtung des Polyprolinanteils

**Abb. IV.6:** Struktureller Vergleich von aPP und pGolemi.

A) und B) Darstellung des hydrophoben Kernbereichs der beiden Peptide. Beteiligte Reste sind als Stäbchen mit entsprechender Nummerierung dargestellt und deren molekulare Oberflächen semi-transparent sichtbar gemacht. C) und D) Helixrad-Darstellung für die helikalen Reste aus aPP und pGolemi. Saure Reste sind rot dargestellt, basische blau, hydrophobe grau und polare hydrophobe mit einem grauen Ring. E) und F) Darstellung des elektrostatischen Oberflächenpotentials der beiden Peptide mit Blick auf den Aminoterminal. Wichtige Reste sind beschriftet. Das Potential wurde mit Hilfe des Programms YASARA im YAMBER2-Kraftfeld berechnet.



empfindlich beeinflussen könnte. Als Konsequenz der veränderten Anordnung der Reste kann ein entropisch günstiges  $\pi$ - $\pi$ -*Stacking* zwischen Tyr26 und Phe2 nicht stattfinden.

Trotzdem bildet sich der für pankreatische Peptide typische hydrophobe Kern zwischen den folgenden Resten von pGolemi aus, wenn auch in leicht abweichender Form (Abb. IV.6.B). Dieses Ergebnis stimmt gut mit einer Studie aus dem Jahr 2006 überein, in der die Struktur eines um drei Aminosäuren gekürzten Peptids aus der Pankreatischen-Peptid-Familie bestimmt wurde. Dieses Konstrukt wies ebenso eine erhöhte Flexibilität und Dynamik auf, ohne jedoch den hydrophoben Kern komplett zu zerstören (Nygaard *et al.*, 2006).

### 1.6.2 Die elektrostatischen Oberflächenpotentiale von pGolemi und aPP unterscheiden sich

Die für die Erstellung von pGolemi eingesetzten Mutationen, die sich vornehmlich auf die ersten 12 Aminosäuren konzentrieren, haben auch einen Effekt auf das elektrostatische Oberflächenpotential des Peptids. Das Wegfallen der letzten Aminosäurereste der Helix lässt den basischen Teil (Abb. IV.6.E und F, blau) aus aPP verschwinden. Vor Allem der Polyprolin-Teil von pGolemi erscheint im Vergleich zu aPP wesentlich weniger geladen. Diese Verringerung von Ladung ist vermutlich für die Bindung an EVH1-Domänen, welche über hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt wird (Ball *et al.*, 2002), von großem Vorteil. Ähnlich wie aPP hat jedoch auch pGolemi einen sauren Schleifenbereich, der sich mit konservierten Resten aus den prolinreichen Tandemrepeats aus ActA deckt (Abb. I.6).

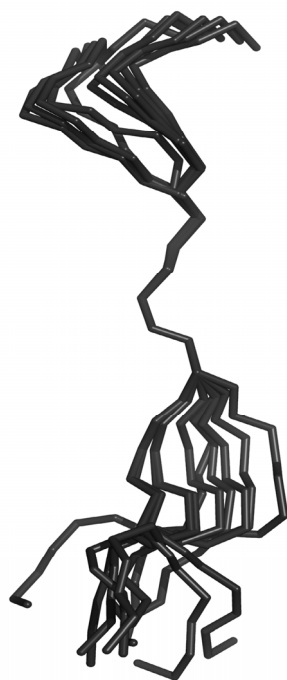
An der Darstellung der Oberfläche wird klar ersichtlich, dass die Form von pGolemi besonders im Schleifenbereich im Vergleich zu aPP deutlich schmaler ist. Durch den veränderten hydrophoben Kern verändert sich auch die Anlagerung des aminoterminalen Teils an die Helix und führt zu einer wesentlich zentrierteren Bindungsfläche. In aPP ist dieser Teil breiter und leicht geneigt; so liegen die Reste Ser3 und Thr6 etwa 9,5 Å in verschobener Anordnung auseinander. Eine solche Geometrie wäre für die Interaktion mit der schmale Bindungsstelle der Mena EVH1-Domäne (Ievh, Prehoda *et al.*, 1999)

völlig ungeeignet. Die korrespondierenden Reste Phe2 und Thr5 aus pGolemi, beide Teil des kanonischen Bindungsmotivs der ActA-Tandemrepeats (Niebuhr *et al.*, 1997), sind fast parallel und mit einem Abstand von ca. 8,5 Å zueinander orientiert. Es ist anzunehmen, dass diese für die Bindung an EVH1-Domänen optimierte Geometrie bedeutend zur erhöhten Affinität des synthetischen Liganden an die Domäne beiträgt.

### 1.6.3 Der aminoterminaler Teil von pGolemi bildet keine Polyprolin-

#### Helix Typ II

Die finale Strukturschar für pGolemi weist bei genauerer Betrachtung eine optische Zweiteilung auf (Abb. IV.5.C): die ersten zwei Reste zeigen entweder zum Lösungsmittel

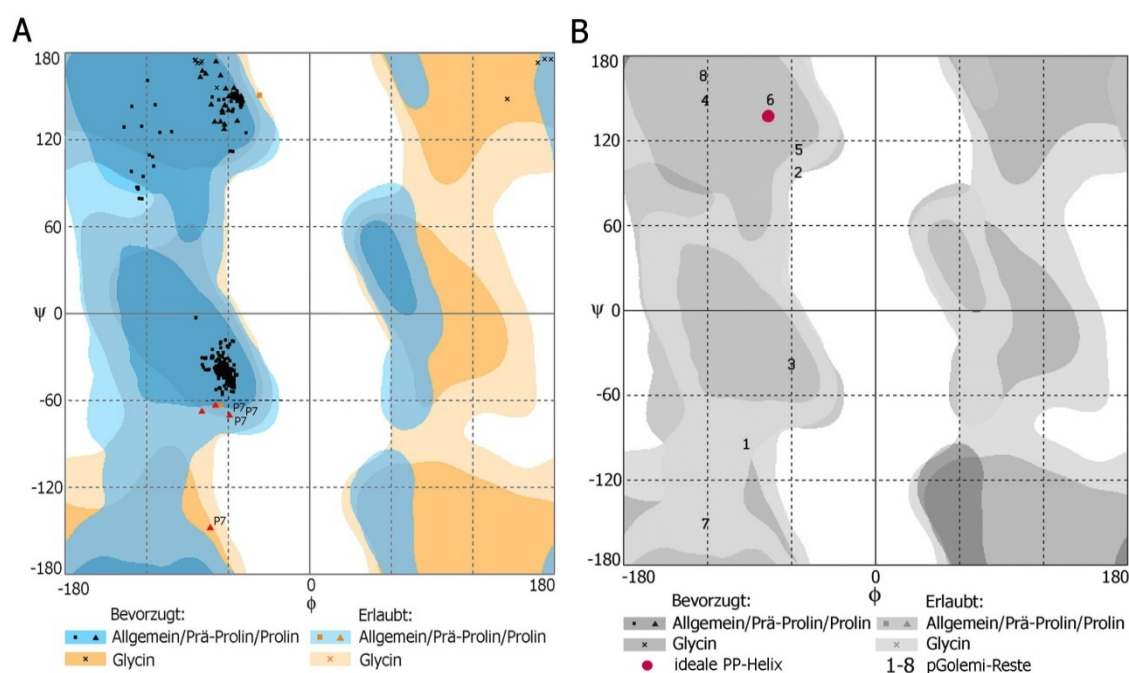


**Abb. IV.7:** Reste 1-11 von pGolemi. Gezeigt ist ein Alignment der Reste 2-8. Die Helix wurde zur Übersichtlichkeit weggelassen.

hin oder haben eine senkrechte Orientierung zur Helix. Zudem scheint der aminoterminaler Teil im Vergleich zur Helix relativ ungeordnet zu sein. Überlagert man jedoch nur den prolinreichen Abschnitt von pGolemi (Aminosäuren 2-8), erhält man eine sehr definierte Anordnung der Reste 4 bis 6 des Peptids (Abb. IV.7). In Übereinstimmung mit dem ermittelten geringen RMSD-Wert von 0,181 Å ist das Ensemble hier sehr kongruent. Bei dieser Darstellung der Strukturen wird jedoch auch eine große konformationelle Variabilität vor Allem für die ersten drei Reste sowie für die Schleifen-Region deutlich. Da eine komplette Zuordnung der NOESY-Signale vorlag und daher durch einen Mangel an zugeordneten NOE-Resonanzen unter-

bestimmte Regionen ausgeschlossen werden können, weist diese Heterogenität entweder auf verschiedene, distinkte Konformationen des Peptids in Lösung hin oder auf eine erhöhte Flexibilität des Polyprolinteils. Eine Folge von Berechnungsartefakten kann ausgeschlossen werden, da das gesamte Ensemble keine systematischen Verletzungen der

experimentellen Randbedingungen aufweist und zudem energetisch niedrig und konvergent ist. Die freien und beschränkten kurzen MD-Läufe können hier als Auslotung des konformationellen Raumes angesehen werden (Berndt *et al.*, 1996) und die erhaltenen Konformere daher als zeitliche Mittelung der Bewegung des Peptids. Basierend auf der berechneten Strukturschar kann wohl für die gesamte Bindungsstelle bis auf die beiden zentralen Reste des Polyprolinmotivs eine erhöhte Flexibilität angenommen werden. Diese Annahme sollte jedoch durch Seitenketten- $^{15}\text{N}$ -*hetero*NOE-Messungen sowie Relaxationsmessungen an einer isotopenmarkierten Probe quantifiziert und bestätigt werden.



**Abb. IV.8:** Ramachandran-Darstellung der  $\phi/\psi$ -Winkelkombinationen. **A)** Strukturensemble von pGolemi **B)** Aminoterminaler Teil der minimierten, geometrischen Durchschnittsstruktur von pGolemi. Erstellt mit RamPage (Lovell *et al.*, 2003).

Trotz der Heterogenität der ersten zwölf Aminosäuren sind die Torsionswinkel für die Strukturschar zu 77 % in sterisch besonders bevorzugten Konformationen angesiedelt, wie aus Abb. IV.8 hervorgeht. Hier sind sowohl die gesamte pGolemi-Strukturschar als auch die Reste des Polyprolinteils aus der minimierten geometrischen Durchschnittsstruktur in einem  $\phi/\psi$ -Winkeldiagramm nach Ramachandran aufgetragen (Ramachandran *et al.*, 1963). Die Auftragungen wurden mit Hilfe des Programmes RamPage (Lovell *et al.*, 2003) erstellt. In Teilabbildung A ist die gute Definition des Ensembles zu erkennen – nur

zwei Reste fallen in die großzügig erlaubte Region entsprechend 0,67 % der Schar; 22 % in die zusätzlich erlaubten Bereiche, die übrigen Reste (77 %) befinden sich in bevorzugten Regionen. Die beiden Ausreißer entsprechen jeweils Pro7 aus zwei Konformeren. Diese Aminosäureposition befindet sich genau am Übergang zwischen dem ausgestreckten Polyprolinteil und dem Schleifenbereich von pGolemi und unterliegt daher wohl besonderen konformationellen Ansprüchen. Trotzdem nehmen nur 20 % der Pro7-Konformationen in der Strukturschar sterisch weniger populierte Regionen ein.

Betrachtet man eine Auftragung des aminoterminalen Teils von pGolemi im Vergleich zu den Torsionswinkeln einer idealen PPII-Helix (Abb. IV.8.B) fällt auf, dass nur der in allen Konformeren sehr gut definierte Rest Pro6 eine für die Polyprolinhelix Typ II (PPII) typische Torsionswinkelkonformation aufweist. Alle anderen Aminosäuren sind entweder in ausgestreckter  $\beta$ -Konformation (Reste 2, 4, 5 und 8) oder in völlig anderen Ramachandran-Regionen zu finden. Die breite Streuung der Torsionswinkelkombinationen überrascht, da beim Design von pGolemi strikt darauf geachtet wurde, die PPII-Konformation nicht durch Mutationen zu unterbrechen (Golemi-Kotra *et al.*, 2004).

**Tab. IV.2:** Zusammenstellung der Torsionswinkel der PP-Regionen aus pGolemi und den beiden Substraten in den Komplexstrukturen von EVH1-Domänen und aPP.

Pos.	<u>pGolemi</u>			<u>FP4 : Mena</u>			<u>PRIII : Evl</u>			<u>aPP</u>		
	aa	$\Phi$	$\Psi$	aa	$\Phi$	$\Psi$	aa	$\Phi$	$\Psi$	aa	$\Phi$	$\Psi$
0										G	-64.45	-165.69
1	P	-119.45	-99.79				E	-105.50	-179.25	P	-76.08	147.23
2	F	-54.33	88.99	F	-78.71	155.30	F	-59.39	135.85	S	-65.30	156.03
3	P	-60.17	-46.72	P	-66.96	161.91	P	-78.48	179.55	Q	-68.88	131.72
4	P	-119.05	138.76	P	-69.17	151.03	P	-68.94	144.31	P	-80.46	150.47
5	T	-56.56	112.44	P	-54.02	168.07	P	-55.98	170.71	T	-64.04	122.19
6	P	-75.10	152.34	P	-	-	P	91.51	151.62	Y	-71.16	120.86
7	P	-120.31	-144.84				T	-	-	P	110.80	-4.73
8	G	64.20	169.82							G	-60.99	148.92
				$\Phi$		$\Psi$						
<u>ideale PPII -Helix:</u>				-78		146						

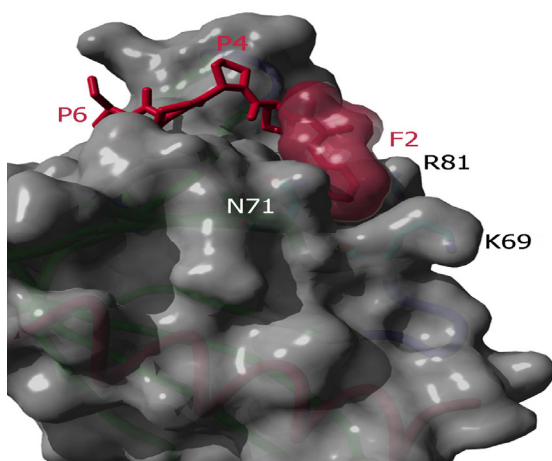
In allen bisher gelösten Komplexstrukturen für EVH1-Domänen wurde das Substrat in PPII-Konformation gebunden (Tab. IV.2; PDB-Einträge 1evh; 1evl; Fedorov *et al.*, 1999; Prehoda *et al.*, 1999) und daher wird eine solche Geometrie als Voraussetzung für eine spezifische Bindung an die Domäne angenommen (Ball *et al.*, 2005).

Die beiden wichtigsten Mutationen zwischen aPP und pGolemi betreffen die Aminosäuren <sup>2</sup>SQ<sup>3</sup> zu <sup>2</sup>FP<sup>3</sup>, welche sich auch in einer erheblichen Differenz der Torsionswinkel niederschlagen (Tab. IV.2).

Diese Mutationen sollten die Geometrie nicht stören, da Phenylalanin theoretisch eine zu Pro vergleichbare PPII-Helix-Neigung aufweist (Rucker *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2001). Vermutlich ist die Substitution von Glutamat zu einem sterisch hoch eingeschränkten Prolin für die stark veränderte Diederwinkelkombination verantwortlich, welche üblicherweise in rechtsgängigen  $\alpha$ -Helices zu finden ist ( $\varphi = -63,8^\circ$ ,  $\psi = 126,8^\circ$ ). Als thermodynamische Erklärung für diese starke Abweichung zur PPII-Konformation kann der entropische Gewinn durch die Ausbildung des hydrophoben Kernbereichs ab Rest 3 (Abb. IV.6.B) angenommen werden. Die Einschränkung der Dynamik bedeutet zwar einen großen Verlust an Freiheitsgraden für das Peptid, aber gleichzeitig auch einen enormen entropischen Gewinn durch die ausgebildeten hydrophoben Wechselwirkungen. Da die ersten Reste keine solchen Interaktionen ausbilden können (s. o.), bleiben diese flexibel und zum Lösungsmittel hin orientiert. Pro3 wirkt folglich mit seinen stark veränderten Torsionswinkeln als Anfangspunkt für den stabilisierenden Kern.

Die Flexibilität des Aminoterminus von pGolemi in Lösung deutet stark auf einen *induced-fit*-Bindungsmechanismus hin, bei dem die richtige Ligandenkonformation, in diesem Fall eine PPII-Helix, erst nach Bindung an die Domäne eingenommen wird. Pro6, welches bereits in der richtigen Konformation vorliegt (Tab. IV.2), könnte als Initiator für die Ausbildung einer PPII-Helix nach einem ersten Kontakt zu der Domäne wirken. Leider konnten bisher keine strukturellen Informationen über weitere freie Liganden von EVH1-Domänen in Lösung gewonnen werden, um deren Bindungsmechanismus und freie Strukturen mit pGolemi zu vergleichen.

Im Gegensatz zu diesem Mangel an strukturellen Informationen der freien Liganden konnte in zahlreichen Studien das Bindungsmotiv für EVH1-Domänen exakt charakterisiert werden. Für das ActA-Protein konnte als Konsensus-Bindungsmotiv die Sequenz xFPP $\Phi$ PTxxEL identifiziert werden, wobei  $\Phi$  einer beliebigen hydrophoben Aminosäure entspricht (Niebuhr *et al.*, 1997). Eine besondere Bedeutung für eine affine Bindung kommt dem Phenylalanin an Position 2 des Motivs zu, wie auch über Mutationsanalysen nachgewiesen werden konnte (Holtzman *et al.*, 2007). Auffällig ist daher, dass besonders dieser Rest im Strukturensamble von pGolemi eine große konformationelle Variabilität zeigt (Abb. IV.5.C, Abb. IV.7).



**Abb. IV.9:** Darstellung der Ligandenbindungsregion der Mena EVH1-Domäne (PDB-Eintrag 1evh). Die molekulare Oberfläche der Domäne sowie des Phenylalanins sind dargestellt. Beteiligte Reste sind nummeriert, rote Reste gehören zum Liganden.

Bei Betrachtung der Komplexstruktur von Mena EVH1 mit einem FP4-Peptid fällt auf, dass das korrespondierende Phenylalanin des Liganden durch die Interaktion mit einer schmalen Vertiefung zwischen drei Resten der Domäne, Asn71, Arg81 und Lys69, an der Bindungsstelle für eine Verankerung des Peptids sorgt (Abb. IV.9). Durch die erhöhte Flexibilität der aminoterminalen Reste könnte die Ausbildung dieser sterisch sehr begrenzten Interaktion erheblich

beschleunigt werden. Möglicherweise wirkt das erste Phenylalanin sogar wie ein „Bindungsschalter“, indem es durch die korrekte Positionierung an der Domäne die übrigen Reste in eine bindungsaktive Konformation zwingt.

Aus dem berechneten Struktur-Ensemble kann zusammenfassend abgeleitet werden, dass die im Vergleich zu natürlichen Sequenzen erhöhte Bindungsaffinität von pGolemi an die Mena EVH1-Domäne aus der spezifischen Kombination von räumlicher Fixierung der korrekten Bindungsgeometrie für die beiden zentralen Prolinreste und Flexibilität der



übrigen Reste herrühren könnte. Die räumliche Beschränkung der Proline ermöglicht die Anlagerung an die schmale Bindungsstelle auf der Mena EVH1-Domäne und die Flexibilität der übrigen Reste erleichtert das schnellere Herstellen der richtigen Konformation für eine optimale Bindung. Für eine Verifizierung dieser Annahme sollte im Folgenden für pGolemi auch eine Struktur im gebundenen Zustand gewonnen werden. Hierzu wurde als Komplexpartner P11 gewählt, ein synthetisches Domänenmimikry, das die hydrophobe Triade der EVH1-Domänen in räumlich richtiger Anordnung präsentieren soll und von dem bereits eine Bindung an pGolemi nachgewiesen wurde (Hunke *et al.*, 2006).

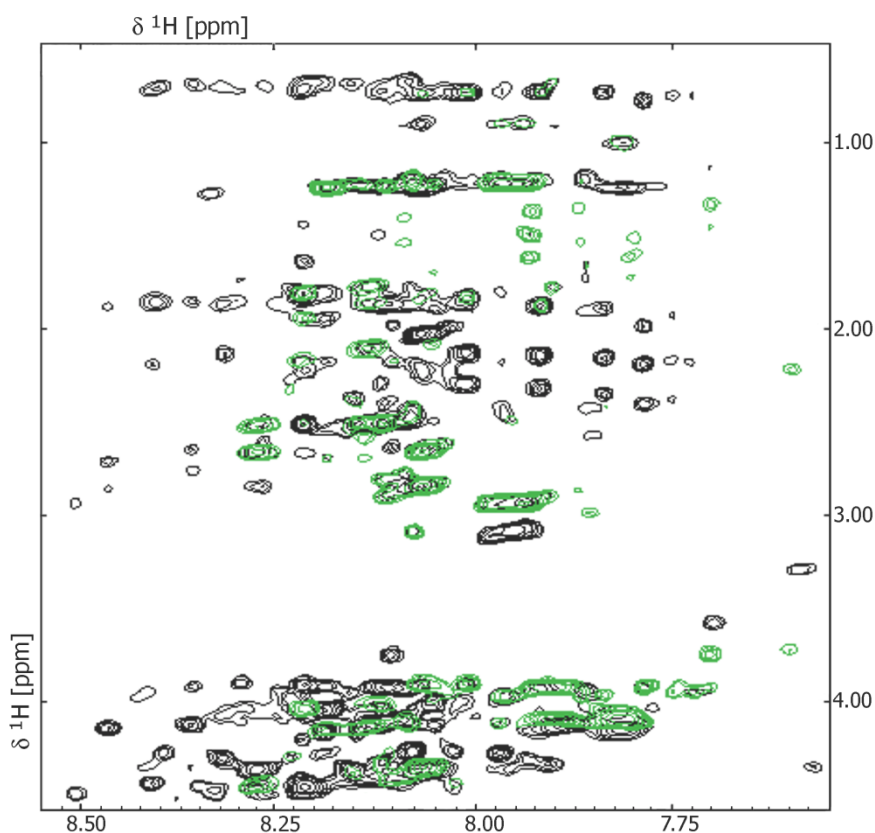
## 2. Analyse der pGolemi:P11-Wechselwirkungen mittels NMR

Um zu überprüfen, ob der aminoterminaler Teil von pGolemi tatsächlich nach der Bindung an die Mena EVH1-Domäne eine PPII-Helix annimmt, wurden zunächst Einzelspektren für das freie Domänenmimetikum und darauf folgend auch Komplexspektren von pGolemi mit P11 aufgenommen.

### 2.1 Vorläufige Zuordnung der erhaltenen P11-Spektren

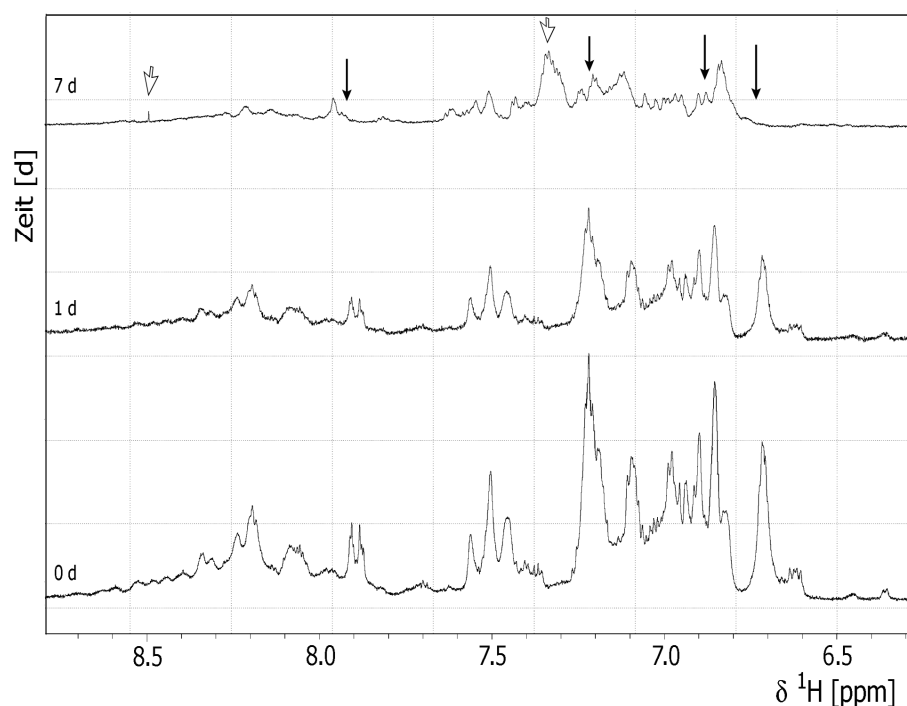
Die sequenzspezifische Zuordnung der NOE-Resonanzsignale des freien P11-Peptids gestaltete sich aus zwei Gründen als äußerst schwierig. Zunächst enthält die Sequenz des Peptids viele gleiche Spinsysteme (Tab. III.1). Allein 11 AMX-Systeme sind vorhanden, also haben fast 40 % des Peptids gleiche Resonanzmuster in den aufgenommenen Spektren. Überdies liegen diese Spinsysteme oft in direkter Folge hintereinander. Die geringe Dispersion der Resonanzen im homonuklearen Spektrum führt daher zu erheblichen Signalüberlappungen (Abb. IV.10) vor allem im wichtigen  $H_N/H_\alpha$ -Bereich und behindert die sequentielle Zuordnung der Resonanzen. Zudem heben sich im TOCSY-Spektrum durch die geringe Intensität nicht alle Spinsysteme vom Hintergrund ab (grünes Spektrum), wodurch die Auswertung zusätzlich erschwert wird. Als weitere Schwierigkeit ist die Präsenz des chemischen Linkers anzuführen. Zwar sind Referenzwerte für die chemischen Verschiebungen der Gruppen aus der *Metabolomics*-Datenbank der BMRB erhältlich, diese decken sich jedoch mit den Verschiebungen von

natürlich vorkommenden Aminosäuren, welche in P11 häufig vertreten sind. So ähnelt zum Beispiel das Spinsystem von Ahx bis auf das  $H_N$ -Signal sehr dem von Lysin, das zwei weitere Male im Peptid vorhanden ist. Vor Allem die Überlappung der Amidprotonenresonanzen macht die Zuordnung anspruchsvoll, da man für die eindeutige Identifizierung der Spinsysteme infolgedessen auf sehr signalreiche Regionen des Spektrums zurückgreifen muss. Aus dem selben Grund stellt neben der Identifizierung dieser Gruppen auch das Finden benachbarter Resonanzen eine Herausforderung dar, da durch den chemischen Linker kein konventionelles „*Chain Tracing*“ vom aminoterminalen zum carboxyterminalen Peptidteil von P11 durchgeführt werden kann. Basierend auf den erhaltenen Spektren können jedoch bereits einige Aussagen über P11 getroffen werden. Obwohl die Dispersion der Amidresonanzen relativ begrenzt ist, deutet diese doch auf einen gewissen Anteil von Tertiärstruktur hin (Abb. IV.10; Cavanagh *et al.*, 2007; Wüthrich, 1986).



**Abb. IV.10:** Überlagerung eines NOESY- (schwarz) und TOCSY-Spektrums (grün) im  $H_N$ - $H_{\alpha}$ /methyl-Bereich von P11. Messbedingungen wie unter Kap. III.3.3.

Die Überlappung der  $H_N/H_\alpha$ -Resonanzen kann sowohl ein Zeichen für konformationelle Umlagerungen im Milli- bis Mikrosekundenbereich als auch ein Zeichen für die Aggregation des Proteins sein (Rehm *et al.*, 2002). In Zusammenhang mit der niedrigen Signalintensität der Spektren ist eher von Instabilität und Aggregation des Peptids in Lösung auszugehen, zumal die P11-NMR-Proben binnen einer Woche eine starke Aggregation aufweisen. Die verschiedenen Linienbreiten im TOCSY-Spektrum deuten jedoch auf dynamischen Umlagerungen des Peptids in verschiedenen Zeitskalen hin, da sowohl scharfe als auch sehr breite Peaks zu sehen sind. Proteindynamik im mittleren Austauschbereich (*intermediate exchange*), also auf der mittleren Mikro- bis Millisekundenskala, führt durch den geringen Unterschied der Rate des chemischen Austausches zum angelegten Magnetfeld zu Linienverbreiterung als Mittelung zwischen den zwei distinkten Zuständen des Systems (Palmer *et al.*, 1996).



**Abb. IV.11:** Vergleich von 1D- $^1H$ -Spektren des P11-Peptids im Lauf der Zeit. Gemessen wurde die gleiche Probe der Konzentration 1 mM zu verschiedenen Zeitpunkten. Messbedingungen wie unter Tab. III.2

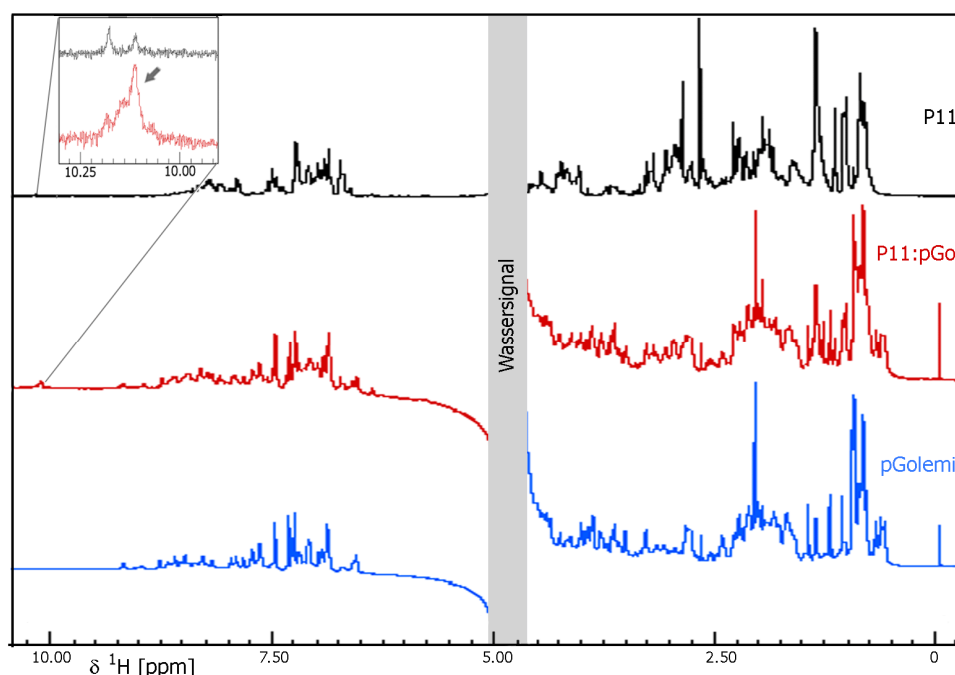
Folglich sind in den P11-Spektren sowohl langsame Bewegungen des Peptids als auch Instabilität zu beobachten, denn neben der Signalüberlappung deutet auch der graduelle Intensitätsverlust der Amidprotonenresonanzen, welcher für drei Zeitpunkte (0, 1 und

7 Tage) in Abb. IV.11 aufgetragen ist, auf die Instabilität des Peptids in Lösung hin. Die Intensität der Signale verändert sich stark mit der Zeit. Zudem verschwinden einige Signale ganz (dunkle Pfeile) während andere neu auftauchen (umrandete Pfeile).

Trotz der erwähnten Schwierigkeiten konnte eine vorläufige Zuordnung einiger Spinsysteme aus den Spektren erfolgen (Kap. VI.2). Eine  $^{15}\text{N}$ -markierte oder sogar  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -doppelmarkierte Probe könnte jedoch durch die Fülle an zusätzlich erhältlichen Informationen den Zuordnungsprozess erheblich vereinfachen.

## 2.2 Analyse der Komplexspektren aus pGolemi und P11

Da eine komplette Zuordnung für pGolemi vorlag, konnten anhand der NMR-Komplexspektren aus pGolemi und P11 Informationen über die Bindung an P11 gewonnen werden. Bei Betrachtung der Komplexspektren im Vergleich zu den



**Abb. IV.12:** Überlagerung der 1D- $^1\text{H}$ -Spektren von pGolemi, P11 und dem Komplex aus beiden. Messbedingungen wie unter III.3.3. Die Vergrößerung zeigt die beiden  $\text{H}_\epsilon$ -Resonanzen aus P11 in freiem (schwarz) und gebundenem (rot) Zustand. Die Intensitäten der Spektren mit P11 wurden zur besseren Übersichtlichkeit erhöht.

Einzelpektren sind nahezu keine Veränderungen zu sehen; sie erscheinen eher als Addition der beiden Einzelpektren, was am Beispiel der 1D-Spektren gut beobachtet werden kann (Abb. IV.12). Bei genauerer Analyse kann jedoch eine spezifische Veränderung des Resonanzsignals der charakteristischen H<sub>ε</sub>-Protonen eines der beiden Tryptophane von P11 im Komplexspektrum gefunden werden (vgl. Vergrößerung Abb. IV.12). Vermutlich handelt es sich hier um das Signal von Trp4, welches ursprünglich ein Teil der hydrophoben Triade in EVH1-Domänen ist. Es zeigt sich Linienverbreiterung und Erhöhung der Intensität. Solche Effekte werden meist durch die Änderungen der chemischen Umgebung der detektierten Protonen hervorgerufen, wie sie bei Wechselwirkungen im Komplex mit pGolemi entstehen könnten.

Da durch ELISA-Kompetitionsexperimente mit Mena und pGolemi bereits von Hunke *et al.* (2006) indirekt eine Bindung von pGolemi an P11 gefunden wurde, sollte anhand der aufgenommenen 2D-Spektren (Kap. III.3.3) diese Bindung durch Veränderungen der chemischen Verschiebung von Resten in pGolemi nachgewiesen werden. Aber auch hier zeigen sich nur kleine Differenzen in der chemischen Verschiebung zwischen den Spektren von freiem und gebundenem pGolemi, die ebenso durch marginale Differenzen im pH des Puffers herrühren könnten (Cavanagh *et al.*, 2007). Sogar die Spinsysteme der Bindungs epitope Phe2 und Thr5, die durch die Bindung eine sehr starke Veränderung der chemischen Umgebung vom Lösungsmittel zum Peptidinneren erfahren sollten, weisen keine signifikanten Verschiebungen der jeweiligen Resonanzen im Amid-, H<sub>α</sub>- oder Seitenkettenbereich auf.

Mit der gewählten Technik konnten also keine hinreichenden Beweise für eine spezifische Bindung von P11 an pGolemi gefunden werden. Mögliche Gründe hierfür sind die gewählte Pufferstärke, die Stärke der Bindung sowie deren Stöchiometrie. In den Kompetitionsexperimenten wurde in einem Puffer mit sehr viel höherer Ionenstärke gearbeitet (phosphatgepufferte Saline mit einem Gehalt von 137 mM NaCl), der die Bindung von pGolemi an P11 beeinflussen könnte. Zudem sind mit NMR-Spektroskopie über chemischen Austausch nur Bindungen nachzuweisen, die im Millisekundenbereich, also bei starker bis mittlerer Bindungsstärke stattfinden. Sollte der Komplex eine große Dissoziationskonstante ( $K_D > 10^{-3}$  M) aufweisen, ist eine Interaktion der beiden Partner

nicht mit den in dieser Arbeit aufgenommenen Spektren und dem daraufhin möglichen Verfahren des *chemical shift mappings* nachweisbar. Hierzu sind spezielle NMR-Techniken, wie  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titrations nach Isotopenmarkierung eines Bindungspartners, *transferred*-NOESY-Spektren (TRNOESY) oder halb-gefilterte NOESY-Spektren mit einer doppelmarkierten Probe notwendig (Vaynberg und Qin, 2006).

Überdies wurden in den gemessenen Spektren beide Kompletteilnehmer in einer Stöchiometrie von 1:1 eingesetzt. Da das Konzentrationsverhältnis der beiden Komplexpartner in den ELISA-Kompetitions-Experimenten bei etwa 1:50 liegen musste (0,1  $\mu\text{M}$  pGolemi zu 5  $\mu\text{M}$  P11), um die Hälfte des gebundenen pGolemi von der EVH1-Domäne abdissoziieren zu lassen, wäre durchaus eine höhere Bindungsstöchiometrie als 1:1 für pGolemi zu P11 denkbar. Schließlich liegt P11 im verwendeten Puffer möglicherweise nicht in einer bindungsaktiven Konformation vor. Diese Annahme wird durch die fortschreitende Aggregation der Probe unterstützt.

Um all diese Faktoren für die Untersuchung der Interaktion von pGolemi und P11 zu optimieren, könnten in weiterführenden Experimenten zunächst die Pufferbedingungen auf Stabilität und Bindung optimiert werden und in einem zweiten Schritt die direkte Bindung der Peptide *in vitro* mittels Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden. Der Rest Trp11 in der hydrophoben Triade ist für derartige Messungen gut geeignet (Ball *et al.*, 2000; Golemi-Kotra *et al.*, 2004; Holtzman *et al.*, 2007; Prehoda *et al.*, 1999). So könnte eine vorläufige Bestimmung der Bindungsstärke erfolgen, bevor die Bindung mit der passenden Technik über NMR weiter charakterisiert werden kann.

### 3. Erstellung von Homologiemodellen für pGolemi, Mena EVH1 und P11

Da die Bestimmung der Komplexstruktur zwischen pGolemi und P11 mittels NMR im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich war, wurde ein Strukturmodell über komparative Molekülmodellierung (Kap. III.5) erstellt. So wurden Aussagen über das potentielle Bindungsverhalten von pGolemi und P11 möglich. Zum Vergleich des

Bindungsverhaltens wurden auch Modelle von pGolemi und der Mena EVH1-Domäne sowie dem zweiten prolinreichen Repeat aus ActA erstellt (Kap. III.5).

### 3.1 Auswahl der Basisstruktur und der Sequenzen

Bisher konnten zwei Komplexstrukturen von EVH1-Domänen mit einem Liganden über Röntgenstrukturanalyse gelöst werden: Mena EVH1 mit einem kurzen Pentapeptid (FP<sub>4</sub>, PDB-Eintrag 1evh, Prehoda *et al.*, 1999) und Evl EVH1 im Komplex mit elf Resten des dritten Prolin-Tandemrepeats (PRIII) aus ActA (PDB-Eintrag 1qc6, Fedorov *et al.*, 1999). Die Evl-Struktur belegt jedoch nur die Bindung des zentralen FP<sub>4</sub>-Motivs an die hydrophobe Triade der Domäne, während die übrigen Reste des *Repeats* zum Lösungsmittel orientiert sind. *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass die Entfernung der konservierten Reste DEL aus dem PRIII-Motiv, welche in der obigen Struktur nicht kokristallisiert wurden, die Affinität des Peptids für Mena 5fach reduziert und die für VASP sogar 10fach (Ball *et al.*, 2000). Demgemäß war es von besonderem Interesse, auch für diese Aminosäurereste eine mögliche strukturelle Rolle bei der Bindung aufzuklären. In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein Komplexmodell zwischen dem PRII aus ActA und den konservierten sauren Resten und der Mena EVH1-Domäne angefertigt (Kap. III.5.2). Das PRII-Motiv wurde wegen seiner hohen Affinität zu Mena- und VASP-EVH1-Domänen gewählt. Dieses Modell diene zusätzlich als Vergleich für das erstellte Mena:pGolemi-Modell (Kap. III.5.2), um die Bindung der beiden Liganden gegenüber zu stellen. Da pGolemi eine hohe paralog-spezifische Affinität für Mena besitzt, wurde für die Modelle jeweils die Struktur der Mena EVH1-Domäne von Prehoda *et al.* (1999; PDB-Eintrag 1evh) verwendet.

Nachdem die Struktur des Komplexes aus P11 und pGolemi auf Grund der Instabilität des Domänenmimetikums und ungünstiger Bindungsdynamiken experimentell nicht mehr gelöst werden konnte (Kap. IV.2.1), wurde auch für diesen P11:pGolemi-Komplex ein Modell angefertigt. Hierfür war zunächst die Erstellung eines strukturierten Modells von P11 nötig (Kap. IV.3.3). Die Mena EVH1-Domäne diene hier gleichfalls als Basis, da P11 genau diese Bindungsstelle nachbilden soll (Kap. III.5.2). Die berechneten Strukturmodelle sollen nun im Einzelnen diskutiert werden.

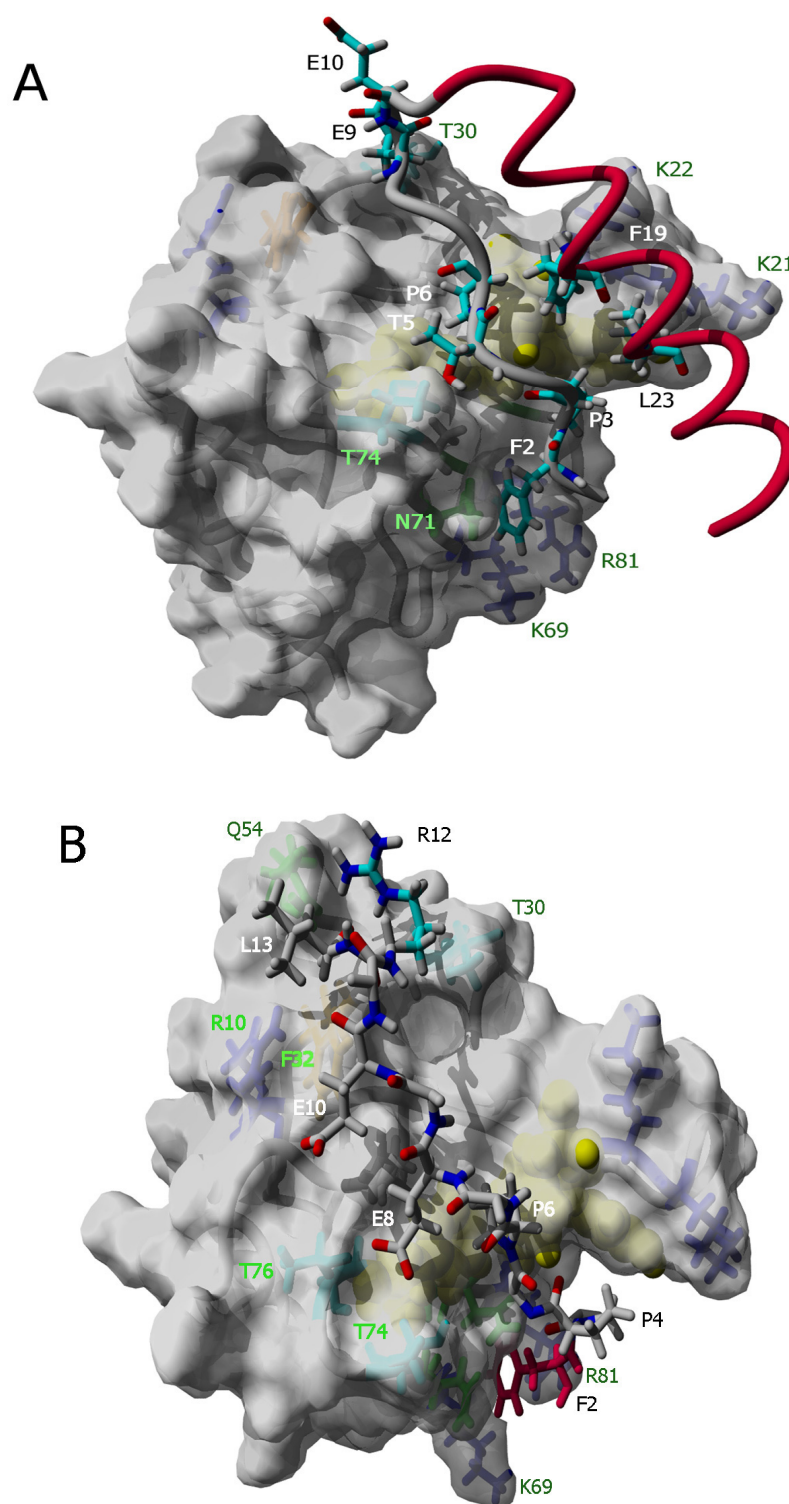
### 3.2 Analyse der EVH1-Komplexe

Die beiden erstellten Komplexe von pGolemi und PRII mit EVH1 sind in Abb. IV.13 zu sehen. Abgesehen von der zentralen Bindungsstelle an der hydrophoben Triade von Mena sind die Bindungsstellen für beide Liganden sehr unterschiedlich.

Im EVH1:pGolemi-Komplex (Abb. IV.13.A) nehmen die aminoterminalen Reste von pGolemi im Gegensatz zu der Struktur in Lösung (Kap. IV.1.6.3) eine Polyprolin-Helix Typ II ein, so dass die Haarnadel-Struktur des Peptids bis zum Aminotermus geschlossen werden kann. Die Faltung wird durch einen neu entstandenen Kontakt zwischen Pro1 und Val30 stabilisiert. Für den gesamten Bereich von Phe2 bis Pro7 kann eine PPII-Geometrie beobachtet werden. Die Reste zeigen durchschnittlich eine Abweichung von 15 % in Phi- und Psi-Winkeln zur idealen PPII-Helix ( $\varphi = -78^\circ$ ,  $\psi = 145^\circ$ ; Cowan und McGavin, 1955), wobei vor allem die Reste nach Thr5 eine sehr kleine Abweichung (<10 %) zu den idealen Winkeln aufweisen. Da die anfängliche Konformation der minimierten Durchschnittsstruktur von pGolemi bei der Erstellung des Modells zu einem ausschließlichen Kontakt von Phe2, nicht jedoch der übrigen Reste an Mena EVH1 führt, scheint diese veränderte räumliche Anordnung notwendig zu sein, um sowohl den Kontakt des bindungsbestimmenden Phe2-Restes als auch der übrigen Rest des FP4-Kernmotivs zu gewährleisten. Das Ergebnis der Modellierung entspricht der geforderten PPII-Geometrie für die Bindung an EVH1-Domänen (Ball *et al.*, 2002, Renfranz und Beckerle, 2002). Der zentrale Prolinteil von pGolemi interagiert in erwarteter Weise mit der Domäne (Kap. VI.5); auch die in der Kristallstruktur 1evh (Prehoda *et al.*, 1999) vorhandene Wasserstoffbrückenbindung zwischen Pro4 des Liganden und Trp23 der hydrophoben Triade von Mena wird ausgebildet. Durch die sterischen Einschränkungen des Haarnadelgerüsts gibt es nur eine Wechselwirkung zwischen den beiden  $\gamma$ -Methylgruppen von Glu9 in pGolemi und Thr30 auf der Domäne, während das zweite konservierte Glutamat, Glu10, zum Lösungsmittel orientiert ist.

Überraschend ist die Teilnahme von vier hydrophoben Resten der carboxyterminalen Helix in pGolemi an der Bindung an Mena. So wechselwirkt Phe19 sowohl mit Lys22 in der Schleifenregion zwischen den Faltblattsträngen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  als auch mit Trp23 auf der EVH1-Domäne, welcher Teil der hydrophoben Triade ist. Auch der Rest Leu23 der Helix





**Abb. IV.13:** Homologiemodelle der Mena EVH1-Domäne in Komplex mit **A)** pGolemi und **B)** PRII. Für B wurde die Domäne um 30 ° entlang der Y-Achse gedreht. Die Liganden sind in Schlauch- oder Stäbchendarstellung, zum Teil nur als Rückgrat-atome, gezeigt. Bindende Reste sind nach ihren Eigenschaften gefärbt: blau basisch, grau hydrophob, cyan polar, grün Amidrest. Die Beschriftung für die Liganden ist schwarz/weiß, für die Domäne grün. Die hydrophobe Triade ist gelb im Kalottenmodell sichtbar, der Rest F32 in golden. Die Bindungs-determinante Phe2 ist in B rot dargestellt.

kontaktiert Mena über eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen den Seitenketten des Leucins und der  $\beta$ -Methylgruppen von Lys21 auf der Domäne. Hier ist ebenso eine Wechselwirkung mit der hydrophoben Triade, über die Seitenkette von Rest Tyr16, zu beobachten. Tyr20 und Leu16 bilden überdies Kontakte zu Lys21 und Lys22 aus.

Zu den in der Kristallstruktur bereits vorhandenen Wasserstoffbrückenbindungen besteht im vorliegenden Mena EVH1:pGolemi-Strukturmodell weiterhin noch eine Bindung zwischen Thr5 in pGolemi und Thr74 auf Mena. Diese zusätzlichen Kontakte mit der Domäne erklären die im Vergleich zu PRII stark erhöhte Gibbs'sche Bindungsenergie von 1,5 kcal/mol (Holtzman *et al.*, 2007), da hier jeweils starke Interaktionen zwischen aromatischen bzw. hydrophoben Aminosäuren stattfinden.

In dem erstellten Mena:PRII-Modell kontaktiert das PRII-Peptid die EVH1-Domäne an der hydrophoben Triade ebenso in einer typischen PPII-Konformation, wobei die Winkel jedoch etwas weniger vom geometrischen Ideal streuen. Hier beginnt die Polyprolin-Helix bereits mit Glu1 und wird nicht - wie in pGolemi - bis zum Gly8 fortgesetzt, sondern endet sofort nach dem zentralen FP<sub>4</sub>-Motiv (Abb. IV.13.B).

Das konservierte Glu1 (Abb. I.6) geht im Mena:PRII-Modell eine ionische Wechselwirkung mit Arg81 der Mena-Domäne ein und scheint die korrekte Positionierung des folgenden Phenylalanins in der schmalen Bindungstasche zu erleichtern. Dies erklärt möglicherweise auch den hohen Grad der Konservierung für eine saure Aminosäure vor dem tief inserierenden Phe2 (Abb. I.6; Ball *et al.*, 2002), da eine elektrostatische Wechselwirkung die korrekte Positionierung stark beschleunigen kann - ähnlich wie die erhöhte Flexibilität des Restes in pGolemi. Zudem wird Phe2 selbst durch Kontakte zu vier Resten der Domäne, Asn71, Asn69, Arg81 und Lys69 perfekt in der Bindungstasche positioniert (Abb. IV.13.B).

Wie in der Kristallstruktur von Prehoda *et al.* (1999) wird auch im Mena:PRII-Modell eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Pro4 und Trp23 der hydrophoben Triade ausgebildet – ferner können jedoch vier weitere Wasserstoffbrückenbindungen, die weder in der Kristallstruktur noch im Modell von pGolemi im Komplex mit der Mena EVH1-Domäne zu finden sind, ausgemacht werden. Die erste Wasserstoffbrücke wird zwischen

der Seitenkette von Glu79 auf der Domäne und Pro3 des Repeats gebildet, das zentrale FP4-Bindungsmotiv erfährt hierdurch eine weitere Stabilisierung.

Durch die ausgestreckte Konformation des Repeats können von der zentralen Bindungsstelle entfernte  $\epsilon$ -Determinanten (Aasland *et al.*, 2002) auf der Mena EVH1-Domäne erreicht werden; also Reste auf der Domäne, die zusätzlich zu den zentralen Substratanforderungen paralog-spezifische Bindung für einen Domärentyp vermitteln. So wird eine weitere Wechselwirkung mit einem polaren Bereich möglich, der hauptsächlich von Threoninen (Gln54, Thr74, Thr76) gebildet wird. Es besteht eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Thr76 auf Mena und der Seitenkette eines weiteren hochkonservierten Glutamates, Glu8, zwei Aminosäuren carboxyterminal zum FP4-Motiv. Glu8 trägt weiterhin auch zur korrekten Positionierung des Liganden durch Interaktionen mit Thr74 in der Nähe der hydrophoben Triade und Phe77 aus der Triade bei. Der Rest Gln54 bildet eine dritte Wasserstoffbrückenbindung zum Rückgrat des Restes Leu13 aus. Die vierte zusätzliche Wasserstoffbrücke wird zwischen dem Rückgrat des Restes Phe32 und dem Carboxyterminus von Leu13 gebildet.

Es überrascht daher nicht, dass Leu13 in drei von vier prolinreichen Tandemrepeats von ActA konserviert ist. Eine solche zusätzliche Verankerung des Liganden ermöglicht die Interaktion der Seitenketten des Leucins mit einer hydrophoben Region auf Mena, unter anderem auch mit der Seitenkette des Phe32 (Abb. IV.13.B, golden dargestellt). Die Wechselwirkung zwischen Leu13 und Phe32 wurde bereits für die Bindung von PRIII an die VASP EVH1-Domäne gefunden (Ball *et al.*, 2000) und daraus folgend die hydrophobe Region um Phe32 als spezifische, zweite Bindungsdeterminante für VASP-Domänen postuliert. Diese Region ist jedoch in allen Ena/VASP-Proteinen vorhanden und insbesondere der Rest Phe32, welcher eine zentrale Rolle für die Bindung von PRII in dem erstellten Modell spielt, ist konserviert (Abb. I.6). Das in dieser Arbeit erstellte Modell deutet eher auf eine allgemeine Bindungsstelle der PR-Sequenzen an EVH1-Domänen hin als auf eine spezifische VASP EVH1-Bindungsdeterminante. Für eine endgültige Klärung wäre es durchaus von Interesse, die Bindung der ActA-Tandemrepeats an die paraloge Evl EVH1-Domäne strukturell zu untersuchen, von der bisher nur die Interaktion des zentralen Motivs nachgewiesen werden konnte (Fedorov *et al.*, 1999).

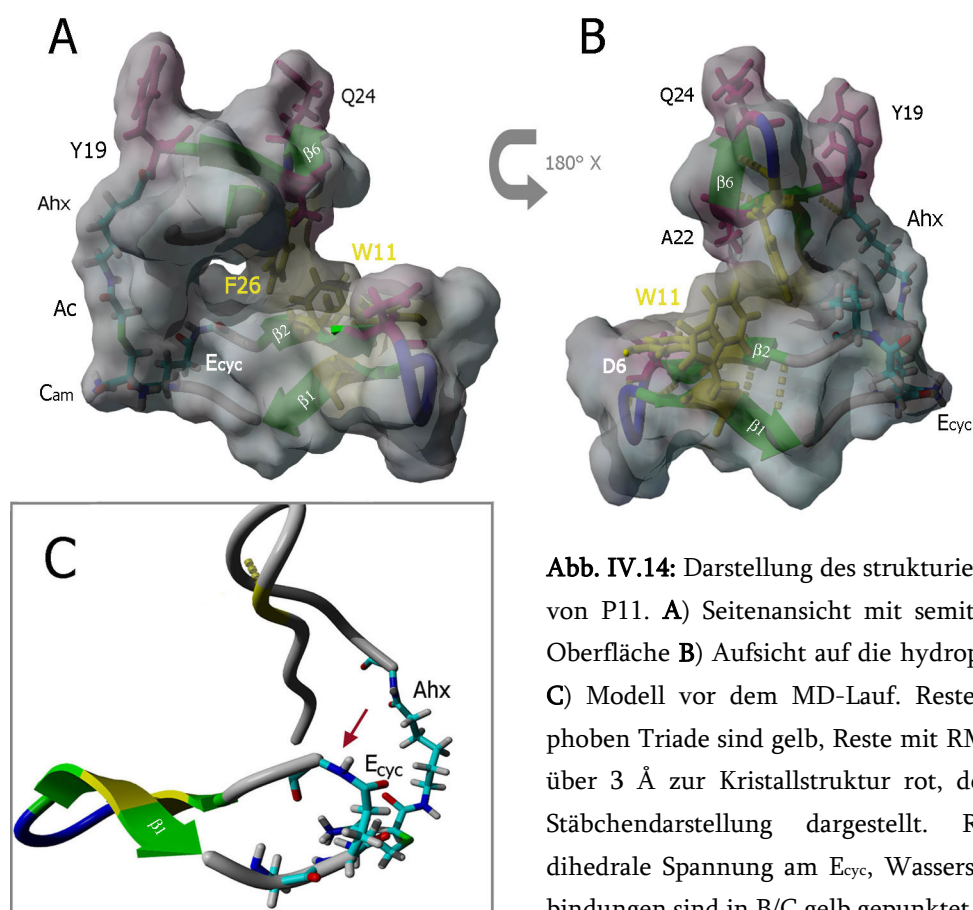
Vergleichend konnte gezeigt werden, dass trotz des gleichen Kern-Bindungsmotivs in beiden Liganden die Bindung des P<sub>RII</sub>-Repeats an der Mena EVH1-Domäne hauptsächlich auf Wasserstoffbrückenbindungen beruht, während pGolemi durch zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen der amphipatischen Helix stabilisiert wird. Zudem kann durch die Länge von P<sub>RII</sub> eine völlig andere Gruppe von Resten zur Bindung beitragen. Trotzdem konnte für pGolemi in Fluoreszenzanalysen eine wesentlich höhere Affinität gegenüber Mena EVH1-Domäne gefunden werden (Golemi-Kotra *et al.*, 2004; Holtzman *et al.*, 2007). Die sterisch stark eingeschränkte Konformation von pGolemi scheint die Bindung an Mena EVH1 zu begünstigen.

### 3.3 Das strukturierte Modell von P11 zeigt konformationelle Beschränkungen des ersten Faltblattes

Da für pGolemi indirekt eine Bindung an das Domänenmimikry P11 nachgewiesen wurde, sollte im Laufe dieser Arbeit der Komplex aus P11 und pGolemi durch komparative Molekülmodellierung erstellt werden. Hierzu war es zunächst nötig, ein strukturiertes Modell von P11 anzufertigen.

Bei der Erstellung des Modells wurden jeweils die bindenden Faltblattstränge entsprechend der Aminosäuresequenz von P11 aus der EVH1-Kristallstruktur (Prehoda *et al.*, 1999) herausgelöst und manuell über den chemischen Abstandshalter (Tab. III.1) im Programm YASARA verbunden (Kap. III.5.2). Für diese chemischen Gruppen wurden Standardbindungslängen und Winkel aus ähnlichen biologischen Verbindungen herangezogen. Bereits hier zeigte sich, dass der verwendete Abstandshalter zwar räumlich in die Struktur passt, jedoch eine sehr gespannte Konformation bedingt. Die Zyklisierung des aminoterminalen Faltblattes stellte sich daher bei der Anfertigung des Strukturmodells als große Herausforderung dar, da der Abstand zwischen den beiden Rückgratresten der Struktur sehr knapp bemessen ist. Die gespannte Konformation spiegelt sich in der Isopeptidbindung zum Val1 wider (roter Pfeil in Abb. IV.14 C), welche erst nach ca. 500 ps Modellierungs-MD-Lauf eine Standardkonformation einnehmen konnte. Diese Konformationsänderung bewirkt jedoch den Verlust der

Faltblattkonformation von zwei weiteren endständigen Resten, Met2 und Pro13. Durch die chemische Verbindung der beiden Stränge geht auch die Faltblatt-Konformation der jeweils beteiligten Endaminosäuren, also Val1, Ala14 und Tyr19 verloren.



Durch die konformationelle Spannung im Modell fällt vor dem Äquilibrierungslauf auch die Sekundärstruktur des zweiten Faltblattes weg (Abb. IV.14.C). Nach der Äquilibrierung nehmen vor Allem die ausgestreckten Reste im komplementären Bereich <sup>25</sup>TR<sup>30</sup>, die in der Kristallstruktur den  $\beta_6$ -Faltblattstrang über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren, eine wellige, stark gekrümmte Konformation ein, welche in der Struktur nicht zu beobachten ist (PDB-Eintrag 1evh). Vermutlich können nur so die nötigen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Strängen geformt werden, deren Ausbildung in der Startkonformation nicht möglich war (Abb. IV.14.B).

Die Berechnung des Schweratom-RMSDs von allen proteinogenen Resten im fertigen Modell von P11 ergibt eine durchschnittliche Abweichung von 2,75 Å zur Kristallstruktur, was auf nicht unerhebliche Veränderungen hinweist. Die größten Differenzen finden sich hier nicht bei den durch den chemischen Linker fixierten Gruppen, sondern in den Rand- und Schleifenbereichen der Faltblattstränge (Asp6, Tyr19, Gln54; in Abb. IV.14 rot dargestellt) sowie in der Mitte des  $\beta_6$ -Faltblattstrangs (Ala22) und am Rest Trp11. Diese hohen Werte ergeben sich aus der Verdrehung des ersten Faltblatts gegenüber der Kristallstruktur sowie der starken Krümmung des zweiten Faltblatts.

Es bleibt offen, ob das erstellte Modell von P11 tatsächlich der Struktur in Lösung entspricht. Über Isopeptidbindungen zyklisierte Peptide kommen auch in der Natur vor; in den bakteriell produzierten und inhibitorisch wirkenden Substanzen Microcin J25, Capistruin und Lariatins (Knappe *et al.*, 2008; Rosengren *et al.*, 2003, Iwatsuki *et al.*, 2006). Diese Peptide sind etwa 16-21 Aminosäurereste lang und falten sich nach der Zyklisierung selbstständig. Den Namen Lasso-peptide erhielten sie aufgrund ihrer Struktur: in den bestimmten Strukturen läuft die Peptidkette des carboxyterminalen Teils durch den achtegliedrigen Macrolactamring und bildet zwischen dem zyklischen und linearen Teil ein antiparalleles Faltblatt aus. Auch für P11 wäre eine solche Anordnung denkbar, da ein Zyklus von 15 Aminosäuren weniger sterische Hinderungen für die Peptidkette verursacht und das „Durchfädeln“ so erleichtert. Zudem wird die Position 19, welche in Klasse II-Lasso-peptiden den Carboxyterminus am Ring verankert, in P11 gleichfalls von einer aromatischen Aminosäure, Tyrosin, eingenommen (Tab. III.1; Wilson *et al.*, 2003). Eine derartige Lasso-Faltung wäre auch in Übereinstimmung mit den erhaltenen Spektren, da die große Linienbreite genau durch solche großskaligen Bewegungen von flexiblen Bereichen des Peptids, wie die eines linearen Carboxyterminus, erklärt würde. Aber auch ein durch die Isopeptidbindung stabilisiertes Faltblatt mit einem ungeordneten und flexiblen zweiten Faltblatt, welches sich erst durch die Bindung an einen Liganden korrekt ausbildet, wäre möglich. Trotz der in dieser Arbeit vorliegenden Hinweise auf ein flexibles, halbgefaltetes Konstrukt wird die genaue Faltung von P11 daher erst nach der Strukturaufklärung vollkommen klar sein.

### 3.4 Informationen aus dem P11:pGolemi-Komplex

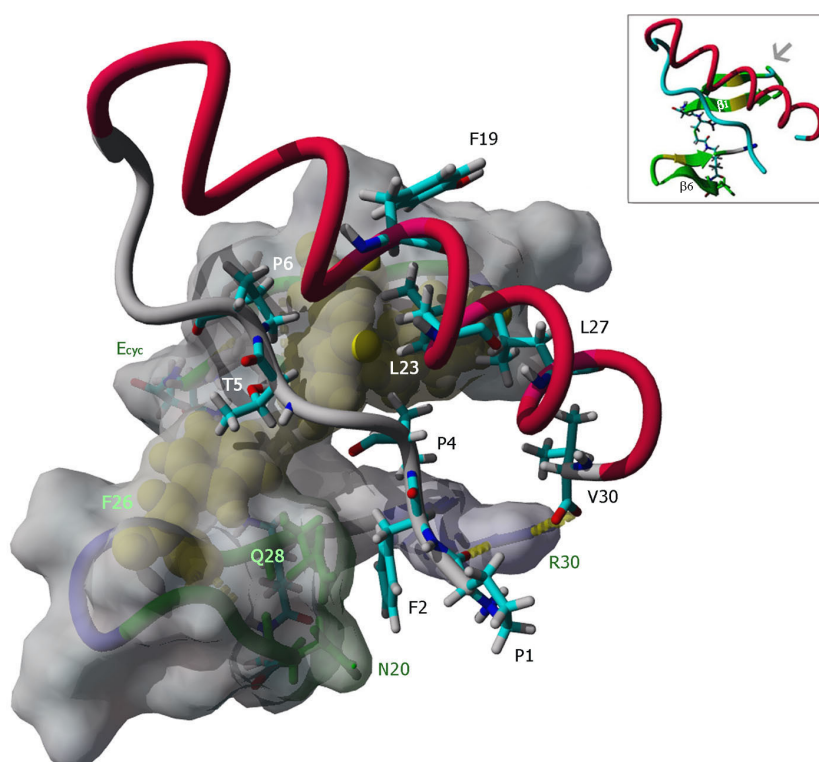
Ausgehend vom Strukturmodell von P11 sollte eine mögliche Bindung an pGolemi studiert werden. Analog zu den durch komparative Molekülmodellierung erstellten Komplexen von pGolemi und PRII mit der Mena EVH1-Domäne wurde für den P11:pGolemi-Komplex die minimierte Durchschnittsstruktur von pGolemi (Kap. III.4.5) und das verfeinerte Homologiemodell von P11 (Kap. III.5.2) herangezogen.

Im Gegensatz zu den anderen erstellten Modellen bildet sich hier keine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Tryptophan der hydrophoben Triade, in P11 Trp11, und Pro4 aus pGolemi aus (Abb. IV.15). Der Abstand zwischen beiden Resten ist zwar nur geringfügig vergrößert (2,84 Å), aber der Winkel zwischen dem Carboxylsauerstoff und dem N $\epsilon$ 1 des Tryptophans ist zu groß, um eine stabile Bindung auszubilden. Die veränderte Positionierung resultiert vermutlich aus der Formung zweier, bisher nicht beobachteter Wasserstoffbrückenbindungen: zunächst entsteht zwischen der Seitenkette des Arg30 in P11 und dem Carboxyterminus in pGolemi (Val30) eine Wasserstoffbrücke, welche pGolemi im Vergleich zu den anderen Modellen leicht kippen lässt. Diese veränderte Anordnung wird von einer zweiten Wasserstoffbrücke zwischen Arg30 und der Seitenkette von Pro1 gefestigt.

Durch die Abwandlung der Interaktion zu Trp4 verändert sich die Bindungsart des FP<sub>4</sub>-Kernmotivs. Zwar werden die Reste der hydrophoben Triade, Tyr4, Trp11 und Phe26 kontaktiert, aber die Orientierung von Pro6 ist hier nicht parallel, wie in der Kristallstruktur (Prehoda *et al.*, 1999), sondern senkrecht zu Trp11. Insgesamt ist das zentrale Motiv zum ersten Faltblatt etwa um 60° gegen den Uhrzeigersinn gedreht. Die PPII-Geometrie des Kernmotivs wird von dieser geänderten Bindung nicht beeinflusst; die Reste Phe2 bis Pro6 liegen weiterhin als Polyprolinhelix vor. Diese endet jedoch im Gegensatz zum EVH1:pGolemi-Modell (Kap. IV.3.2) bereits am Rest Pro7.

Trotz des relativ losen Kontakts von pGolemi zu P11 können einige Gemeinsamkeiten mit dem erstellten EVH1:pGolemi-Modell ausgemacht werden. So wird Phe2 von den Resten Arg30 (Arg81 in Mena), Asn20 (Asn71) und Gln28 (Gln78) in Position gehalten. Der vierte Rest der Bindungstasche für Phe2, Lys69, wurde in P11 durch einen starren Ahx-

Linker ersetzt (Tab. III.1) und kann daher nicht zur Bindung beitragen. Auch bei der Bindung von pGolemi zu dem Domänenmimetikum P11 nehmen Reste der amphipathischen Helix teil: die Reste Phe19, Leu23 und Leu27 bilden Kontakte zur Domäne aus. Es werden jeweils Wechselwirkungen mit Resten der hydrophoben Triade eingegangen: Leu23 und Phe19 kontaktieren Trp11, Leu27 kontaktiert Tyr4. Der dritte Rest der Triade, Phe26, wechselwirkt nur mit der  $\gamma$ -Methylgruppe des Thr5 in pGolemi und scheint an der Bindung von pGolemi nicht signifikant beteiligt zu sein.



**Abb. IV.15:** Homologiemodell von P11 im Komplex mit pGolemi. Bindende Reste und der chemische Linker sind in Stäbchendarstellung gezeigt und nach ihren Eigenschaften gefärbt: blau basisch, grau hydrophob, grün Amidrest. Die Beschriftung für den Liganden ist schwarz, für das Domänenmimetikry P11 grün. Die hydrophobe Triade ist gelb im Kalottenmodell sichtbar. Im Kasten ist eine verkleinerte Bänderdarstellung des Modells zur Orientierung abgebildet, die starke Krümmung ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die geringe Beteiligung von Phe26 ist unerwartet, da der durchschnittliche RMSD-Wert der proteinogenen Aminosäuren des Modells zur Mena EVH1-Kristallstruktur bei 1,62 Å liegt. Die Einzelwerte für die hydrophoben Reste liegen bei etwa 2,5 Å, wobei der Wert



für Phe26 mit nur 1,08 Å wesentlich kleiner ist. Die extreme Krümmung des zweiten Faltblatts, wie sie für das strukturierte P11-Modell zu beobachten war (Kap. IV.3.3) gleicht sich ebenfalls wieder an die Anordnung im Faltblatt an. Daher ist eine veränderte Bindung an Phe26 auf Grund von sterischer Hinderung auszuschließen. Vermutlich ist der geringe Kontakt mit diesem Rest der hydrophoben Triade eine Folge der veränderten Anordnung des FP<sub>4</sub>-Kernmotivs.

Die größte RMSD-Abweichung von über 5 Å ist im zweiten Faltblattstrang  $\beta_2$  zu beobachten, welche aus der stark gekrümmten Schleifenregion der Reste Tyr16-Asn20 resultiert. Die große Verformung des *Turn*-Bereichs ist gut in der verkleinerten Bänderdarstellung des Modells zu sehen (Pfeil im Kasten der Abb. IV.15). Grund für diese Änderung der Struktur sind zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen in diesem Bereich ausgehend von Asp17 zum Rückgrat von Ala19 und Asn20. Auch die Position des Restes Tyr4 aus der hydrophoben Triade wird von dieser starken Krümmung beeinflusst. Trotz einer Abweichung von 2,34 Å zur Kristallstruktur werden hier Kontakte zu Pro3 des Liganden, wie sie auch im EVH1:pGolemi-Modell zu finden sind, ausgebildet. Zusätzliche hydrophobe Kontakte, zwar ausgehend von Leu27 statt von Leu23 aus pGolemi, sind im P11:pGolemi-Modell ebenso vorhanden. Daher scheint die Krümmung des *Turns* die Bindungsfähigkeit nicht wesentlich zu beeinflussen.

Im Gegensatz zu den anderen Modellen bindet pGolemi an P11 im erstellten Homologiemodell über zwei Wasserstoffbrückenbindungen an Arg30, während der konservierte hydrophobe Bindungsmechanismus für EVH1-Domänen nur noch in modifizierter Weise erhalten bleibt. Trotzdem scheint für ein Mimetikum der Bindungstriade eine affine Bindung an pGolemi möglich; auch wenn für die Bindung eine andere Gruppe von Resten herangezogen wird. Eine definitive Aussage über die Bindung von P11 an pGolemi kann jedoch nur über die direkte Charakterisierung zunächst im Fluoreszenz-Spektrometer und später über die Bestimmung der Komplexstruktur erfolgen.

## 4. Biologische und mechanistische Implikationen

### 4.1 Die bindungsvermittelnden Reste in pGolemi gruppieren sich in zwei Kategorien

Die Affinität von pGolemi zu den drei paralogen Ena/VASP-Familienmitgliedern Mena, VASP und Evl wurde durch Fluoreszenzperturbationsexperimente mit Mutanten des Miniaturproteins untersucht (Holtzman *et al.*, 2007). Die Studie ergab teilweise eine drastische Reduktion der Affinität beim Austausch bestimmter Reste gegen Alanin. Diese Veränderungen können jedoch mit der in dieser Arbeit bestimmten Struktur von pGolemi gut erläutert werden. Die Mutationen gliedern sich in zwei Kategorien: zum Einen Reste, die das klassische Bindungsmotiv für EVH1-Domänen betreffen und zum Anderen Reste, die durch Seitenkettenwechselwirkungen die Struktur des Liganden erhalten und die eine optimale Bindung ermöglichen. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Fluoreszenz-Studie im Kontext mit der Struktur von pGolemi diskutiert werden.

#### 4.1.1 Nur ein funktioneller hydrophober Kern führt zu optimaler

##### Bindungsgeometrie an Mena

Die klassische Sequenz der pankreatischen Peptide wurde beim Design von pGolemi durch Mutationen verändert (Golemi-Kotra *et al.*, 2004; Abb. I.6; Kap. I.5.1). Diese Änderungen betreffen nicht nur den Aminoterminus von pGolemi (Kap. IV.1.6.1), sondern auch den Rest Pro6, der als einziger der hydrophoben Reste aus aPP ausgetauscht wurde. Diese Position wird in aPP von einem Tyrosin besetzt und stabilisiert die Faltung des Peptids über orthogonale  $\pi$ -Wechselwirkungen mit Phe19. Obwohl diese Wechselwirkung durch die Substitution des aromatischen Rings nicht mehr stattfinden kann, scheint das Prolin den Kern in ähnlicher Weise zu festigen. Die Orientierung des Restes ist nun nicht mehr senkrecht zum F19, sondern parallel (Abb. IV.6.B). Ersetzt man Pro6 mit einem Alanin, verringert sich die Bindungsfähigkeit der pGolemi-Mutante an Mena 15fach (Holtzman *et al.*, 2007), ein starkes Anzeichen für die strukturelle Stabilisierung des Haarnadel-Peptids durch die hydrophoben Interaktionen des Prolins mit Phe19. Hier muss jedoch auch die direkte Rolle von Pro6 bei der Bindung an die

hydrophobe Triade berücksichtigt werden (Kap. IV.1.6.3). Eine wesentlich größere Verschlechterung der Affinität erhält man bei Mutation des Restes Pro7, der mit Leu16 und dem in der Mitte des  $\beta$ -Turns gelegenen Ala11 wechselwirkt. Da diese Kontakte über Seitenketten vermittelt werden, können mit einem Alanin auf Position des Pro7 keine hydrophoben Wechselwirkungen zwischen diesen Resten ausgebildet und möglicherweise als Folge die komplette Faltung zerstört werden. Nachdem der Austausch der stabilisierenden Aminosäure Pro7 eine so drastische Reduktion der Affinität zu Mena nach sich zieht, ist von einer Notwendigkeit des Haarnadelgerüsts auszugehen. Interessanterweise verändert eine Mutation der beiden anderen Reste, Ala11 und Leu16, die Affinität zu Mena nur geringfügig. Hier handelt es sich um Ersatz von aliphatischer Aminosäure zu aliphatischer Aminosäure und nicht um den Austausch des sterisch sehr anspruchsvollen Prolins, die Effekte dieser Mutationen sind daher wohl nicht so stark.

Die Summe der in der Holtzman-Studie (Holtzman *et al.*, 2007) gewonnenen Affinitätsveränderungen an Mena-EVH1 ist in Abb. IV.16 aufgetragen. Eine gleichbleibende Bindung zu Mena ist blau dargestellt, eine Verschlechterung prozentual in rot. Keine der Mutationen führt zu einer Verbesserung der Bindung an Mena, was die optimale Aminosäurezusammensetzung von pGolemi unterstreicht.

Obwohl die bindende Sequenz zwischen pGolemi und den prolinreichen Tandemrepeats von ActA zu 72 % gleich ist, bindet pGolemi Mena in Fluoreszenzmessungen mit einem  $K_D$  von 0,6  $\mu$ M, im Vergleich zum ersten Repeat also 10mal besser (Holtzman *et al.*, 2007). Folglich scheint die räumliche Anordnung der Spezifitätsreste über die Wechselwirkungen mit der carboxyterminalen Helix in pGolemi zu einer optimalen Bindungsgeometrie zu führen. Dieser Effekt kann jedoch durch Mutation der Reste, die für die Stabilität des „Gerüsts“ sorgen, fast komplett aufgehoben werden (s. o.). Ein intakter hydrophober Kern ist also eine Voraussetzung für die hochaffine Bindung von pGolemi an die Mena EVH1-Domäne.

#### 4.1.2 Die Aminosäuren im prolinreichen Teil sorgen für hochaffine Bindung

Neben den Effekten von Pro6 und Pro7 ist für die bindenden Reste im Aminoterminus von pGolemi nur noch die Mutation zweier Reste mit einer drastischen Verringerung der Affinität verbunden: die von Thr5 und die der Bindungsdeterminante Phe2. Phe2 zeigt zum Lösungsmittel und scheint flexibel zu sein (Kap. IV.1.6.3), was auf eine Rolle als „Bindungsschalter“ hinweist. Nach einem initialen Kontakt des Restes mit der Domäne werden vermutlich große konformationelle Änderungen veranlasst, die erst die korrekte Bindung an die Domäne ermöglichen. Diese Annahme wird auch durch die starke Reduktion der Affinität zu Mena und VASP bei Ersatz von Phe2 untermauert (Holtzman *et al.*, 2007). Die Bindungstasche, in die sich das Phenylalanin über hydrophobe Seitenkettenwechselwirkungen positioniert, ist konserviert. Ein Alanin, das nur eine Methylgruppe als Seitenkette und ein kleines molekulares Volumen von  $68,9 \text{ \AA}^3$  besitzt, kann einen großen Rest wie Phenylalanin mit einem molekularen Volumen von  $130,1 \text{ \AA}^3$  nicht ersetzen und folglich auch nicht die Bindung des Substrats initiieren. Dies würde auch die nur wenig verschlechterte Bindung der Phe2Leu-Mutante erklären. Da Leucin eine voluminöse, verzweigte Seitenkette und ein molekulares Volumen von  $104,1 \text{ \AA}^3$  besitzt, scheinen diese Kontakte zur Domäne zu genügen, um eine Bindung zu ermöglichen. Zwar ist Leucin nicht im Konsensusmotiv für die PR-Tandemrepeats enthalten (Niebuhr *et al.*, 1997), aber es ist in den Aminosäureanforderungen für das Sequenzmotiv von EVH1-Domänen der Klasse 1, zu denen die Ena/VASP-Proteine gehören, enthalten (Ball *et al.*, 2002).

Thr5 wurde bei der Erstellung von pGolemi aus der Sequenz von aPP übernommen und stellt die einzige Veränderung des kanonischen FP4-Motivs der PR-Repeats dar. Wie in aPP ist auch in pGolemi dieser Rest zum Lösungsmittel hin orientiert und macht nur Rückgratkontakte mit der amphipathischen Helix. Trotzdem resultiert eine Alanin-Mutation auf dieser Position in einer vierfach verringerten Affinität zur Mena EVH1-Domäne im Vergleich zum unveränderten Peptid. Da eine gestörte PPII-Geometrie auf Grund der hohen PPII-Helix-Neigung von Alaninen auszuschließen ist (Rucker *et al.*, 2003), kann diese Verringerung nur auf dem Wegfall der Wasserstoffbrückenbindung zwischen Thr74 und Thr5 beruhen, welche das zentrale FP4-Motiv im erstellten

Strukturmodell zusätzlich stabilisiert (Kap. IV.3.2). In der Kristallstruktur des Mena:FP4-Komplexes kontaktiert das korrespondierende Prolin den Rest Phe77 auf der Domäne über hydrophobe Wechselwirkungen. Über den Ersatz des Prolinrings durch eine polare Aminosäure werden zwar diese Wechselwirkungen aufgehoben, aber zusätzlich zu den im Vergleich zum Prolinring schwächeren Interaktionen der  $\gamma$ -Methylgruppe des Threonins kann eine Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet werden.

Im P11:pGolemi-Modell übernimmt dieser Kontakt sogar den Platz der Pro6-Bindung und trägt hauptsächlich zur Bindung an Phe26 aus P11 bei (Kap. IV.3.2 und 3.4). Da Thr5 im ungebundenen Zustand ins Lösungsmittel hinausragt und eine räumlich fixierte Position hat, könnte dieser Rest als zweite Spezifitätsdeterminante nach Phe2 wirken (Kap. IV.4.2.2).

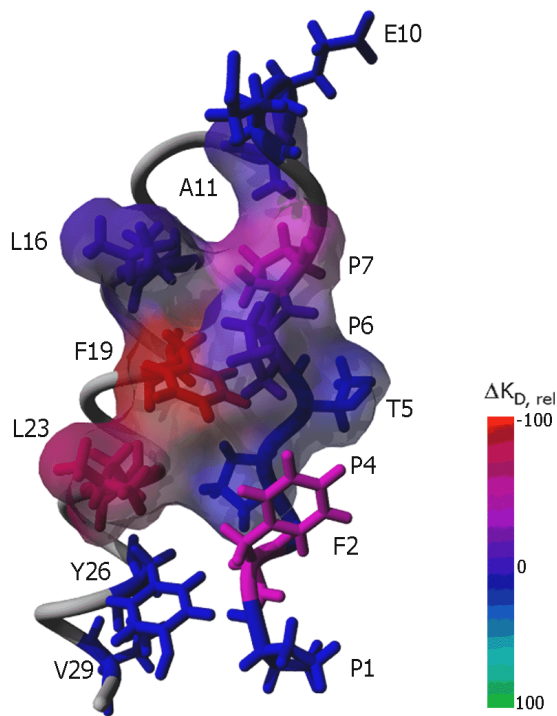
#### **4.1.3 Zusätzliche Helixkontakte sind essentiell für die Bindung**

Bei Betrachtung der Alaninmutationen fällt auf, dass die stärkste Verschlechterung der Affinität zu Mena nicht durch einen Austausch im aminoterminalen Teil verursacht wird, sondern durch die Mutation eines Restes der Helix, Phe19. Der aromatische Rest ist sowohl für die Stabilisierung des hydrophoben Kerns als auch für zusätzliche Kontakte zur Mena EVH1-Domäne verantwortlich (Kap. IV.3.2) und dessen zugehörige Alanin-Mutante Phe19Ala zeigt in der Holtzman-Studie ein starkes Aggregationsverhalten. Das Phenylalanin liegt genau im Zentrum des hydrophoben Kerns und scheint eine tragende Rolle für die korrekte Faltung des Peptids zu haben.

Die zweitgrößte Verschlechterung wird erneut durch einen hydrophoben Rest der Helix verursacht: Leu23. Genau wie Phe19 wirkt der Rest sowohl bei der Stabilisierung des Kerns als auch durch zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen bei der Bindung an Mena mit (Kap. IV.1.6.1, Kap. IV.3.2).

Der teilweise Verlust der Faltung durch die Alanin-Substitution dieser beiden Helix-Reste sowie die resultierende, drastische Reduktion der Affinität zur Mena EVH1-Domäne, welche stärker ist als die für die Bindungsdeterminante Phe2, unterstreichen die Wichtigkeit dieser Aminosäuren für eine optimale Bindung an Mena. Offensichtlich ist neben der korrekten Verankerung des Liganden über das tief inserierende Phenylalanin

auch die Form von pGolemi von essentieller Bedeutung für die hochaffine Bindung an die EVH1-Domäne.



**Abb. IV.16:** Darstellung der Effekte von einzelnen Alaninmutationen auf die Affinität von pGolemi zu Mena. Die Affinitäten sind jeweils auf den größten negativen (rot) (=100%) Wert normiert. Mutationen ohne Effekt auf die Bindung sind blau dargestellt. Untersuchte Reste sind im Stäbchenmodell gezeigt und nummeriert.

## 4.2 Die Mena-spezifische Bindung ist eine Konsequenz der stark eingeschränkten Konformation von pGolemi

Obwohl die Ena/VASP-Familie untereinander eine hohe Sequenzkonservierung aufweist und in Säugetieren eine Sequenzidentität von bis zu 70 % besitzt (Gertler *et al.*, 1996), sind die Substratpräferenzen sehr unterschiedlich. Dies wird vor Allem durch die Betrachtung der unterschiedlichen Bindungsprofile von pGolemi-Mutanten klar, die von Holtzman *et al.* (2007) untersucht wurden. Die Affinitäten aus dieser Studie sind graphisch, wie unter IV.4.1 beschrieben, aufgetragen; Abb. IV.17 zeigt die stabilisierenden Reste der Helix., Abb. IV.18 zeigt die bindenden Reste von pGolemi. Während keine Alanin-Substitution eine Verbesserung der Bindung an Mena bewirken konnte (Abb. IV.16), wurden für die beiden paralogen Domänen VASP und Evl teilweise sehr starke Erhöhungen der Affinität festgestellt. Überraschend ist insbesondere das

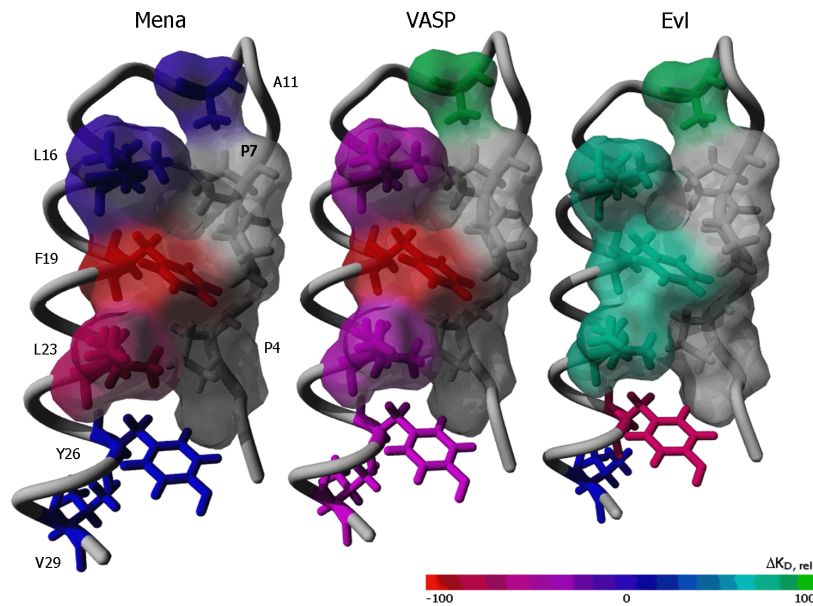
Bindungsprofil der Evl-EVH1-Domäne, das sich stark von dem für Mena und VASP unterscheidet.

#### 4.2.1 VASP hat eine ähnliche Bindungsspezifität wie Mena

Beim Vergleich der Mutationsprofile fällt auf, dass sich Mena und VASP bis auf wenige Ausnahmen, die noch im Einzelnen besprochen werden, ähneln. Evl zeigt jedoch teilweise sogar gegenläufige Veränderungen der  $K_D$ -Werte zu denen von Mena und VASP, obwohl die Sequenzen der Mena und VASP EVH1-Domänen zueinander nicht ähnlicher sind als zu Evl (Abb. I.3). Daher liegt der Grund für die Diskrepanzen zwischen dem Mena/VASP-Bindungsprofil und dem von Evl wohl in der Struktur der Bindungsstellen, welche nicht durch die konservierten hydrophoben Reste bestimmt wird, sondern durch die variable Aminosäurezusammensetzung der nahe liegenden Schleifenregionen (PDB-Einträge 1evh für Mena, 1qc6 für Evl und 1egx für VASP). Trotz dieser Unterschiede konnte die Bindung aller drei paraloger Proteine an die prolinreichen Repeats von ActA nachgewiesen werden (Niebuhr *et al.*, 1997). Die Bindungsspezifität der Evl EVH1-Domäne wurde allerdings bisher nur in der Fluoreszenz-Studie von Holtzmann *et al.* (2007) genauer untersucht.

#### 4.2.2 Evl und VASP bevorzugen eine gestreckte Konformation des Substrats

Die Ergebnisse von Holtzmann *et al.* (2007) weisen darauf hin, dass die Evl EVH1-Domäne eine eher flache und gestreckte Konformation des Liganden bevorzugt. Unter Anderem kann dies von den Effekten der Mutation des Restes Ala11 abgeleitet werden, der bei Mutation in ein Leucin eine 20fache Verringerung der Affinität für Mena verursacht. Die gleiche Mutation bewirkt jedoch eine Verdopplung der Affinität zu VASP und eine Vervierfachung der Affinität zu Evl. Ala11 ist nicht direkt in der Domäneninteraktion involviert. Der Rest ist jedoch maßgeblich an der Ausbildung des hydrophoben Kerns zwischen dem Polyprolinteil über Kontakte zu Pro7 und der Helix über Val13 und Asp15 beteiligt, was durch die Existenz von mehreren starken mittelweiten NOEs zwischen diesen Resten bestätigt wird (Kap. VI.1, Abb. IV.5.B).



**Abb. IV.17:** Darstellung der Effekte von Alaninmutationen im hydrophoben Kern auf die Affinität von pGolemi zu den einzelnen Ena/VASP-Mitgliedern. Die Werte sind jeweils auf den größten negativen (rot) oder positiven (grün) Einfluss ( $\pm 100\%$ ) normiert. Mutationen ohne Effekt auf die Bindung sind blau dargestellt. Untersuchte Reste sind im Stäbchen-Modell gezeigt und in der linken Struktur nummeriert.

Die äußere Form von pGolemi, welche durch die korrekte Positionierung des  $\beta$ -Turns und stabilisierende Kontakte zur Helix gefestigt wird, ist essentiell für eine hochaffine Bindung an die Domänenoberfläche. An der Position des Alanins ( $i+3$ ) gibt es in klassischen  $\beta$ -Turns keine Präferenz für Leucine (Hutchinson und Thornton, 1994); durch die sterisch sehr eingeschränkte Haarnadelstruktur in pGolemi könnte die Substitution von Ala11 zu Leucin mit seiner verzweigten Seitenkette zusätzlich zu großen Änderungen der Struktur führen. Der *Turn*-Bereich könnte entweder in die Länge gezogen und deformiert oder auch komplett zerstört werden. Eine als Folge dessen stärker gestreckte Konformation der aminoterminalen Spezifitätsreste in pGolemi würde auch die veränderten Bindungskinetiken der drei Paraloge erklären. Während Evl an PRI aus ActA am Besten bindet - gefolgt von Mena und mit einer viel geringeren Affinität VASP -, sind die Affinitäten von pGolemi zu den drei Domänen genau anders herum: Mena wird am Besten gebunden ( $0,6 \mu\text{M}$ ), gefolgt von VASP ( $13 \mu\text{M}$ ) und Evl ( $>100 \mu\text{M}$ ) (Holtzman *et al.*, 2007). Bei PRI liegt wahrscheinlich eine gestreckte Konformation vor, während



pGolemi durch die Kontakte mit der carboxyterminalen Helix in eine gespannte und gebogene Konformation gezwungen wird (Tab. IV.2).

Anhand der oben beschriebenen Affinitäten ist anzunehmen, dass Evl eine eher gestreckte Konformation des Substrates bevorzugt; bei Mena und VASP scheint die strukturierte Form von pGolemi von Vorteil zu sein. Wie auch das Bindungsprofil der Evl-Domäne unterstützt die Veränderung der Bindung durch die Ala11Leu-Mutante diese Annahme: jede Substitution, die zu einer Reduktion des Seitenkettenvolumens führt, erhöht die Affinität von pGolemi an Evl (Abb. IV.17 und 18).

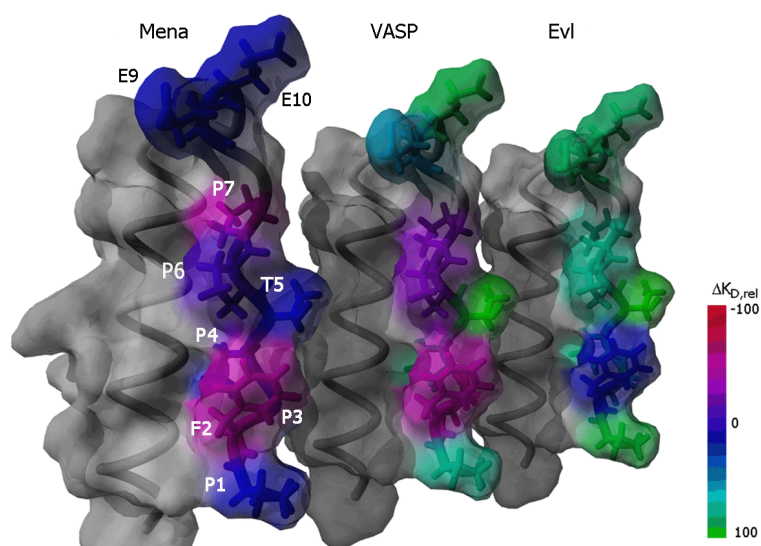
Auch die Affinitäten der Leu23Ala-Mutante ergeben ein ähnliches Bild. Obwohl Leu23 ein integraler Teil des hydrophoben Kerns ist und sowohl die Struktur von pGolemi stabilisiert als auch bei zusätzlichen Kontakten mit der Mena EVH1-Domäne beteiligt ist (Kap. IV.3.3.2), erfolgt bei Austausch dieses Restes mit einem Alanin eine Verdopplung der Affinität von pGolemi an Evl. Eine Mutation an dieser Stelle destabilisiert die Faltung des Peptides empfindlich, was an der starken Reduktion der Helizität dieser Mutante deutlich wird (Holtzman *et al.*, 2007). Die gleiche Mutation führt zu einer 130fachen Verschlechterung der Bindung an die Mena EVH1-Domäne. Sogar die Substitution des Bindungsepitops Phe2 durch Alanin führt nicht in einer wesentlichen Verschlechterung des  $K_D$ -Wertes für Evl. Dieses überraschende Bindungsprofil zeigt, dass die Optimierung der Reste trotz der hohen Konservierung der Paraloge untereinander zu einer spezifischen Erhöhung der Affinität von pGolemi zu Mena geführt hat und jedes Paralog einer eigenen Optimierung des Liganden bedarf, um eine hochaffine Bindung sicher zu stellen.

### 4.3 Die Homologiemodellierung der EVH1-Komplexe deckt zwei

#### $\epsilon$ -Determinanten von EVH1-Domänen auf

Der Wegfall der konservierten DEL-Reste aus dem PRII-Motiv führt zu einer 5fachen Verringerung der Affinität zur Mena EVH1-Domäne und einer 10fachen Verringerung der Affinität zur VASP EVH1-Domäne (Ball *et al.*, 2000). Im Gegensatz hierzu stehen die Resultate der Alanin-Mutationsstudie, die bei Substitution der sauren Reste im Schleifen-

bereich von pGolemi für Mena eine Halbierung der Affinität nach sich ziehen, während die Bindung an Evl und VASP bis zu 5fach verstärkt wird (Abb. IV.18). Dieses zunächst widersprüchlich erscheinende Verhalten kann im Zusammenhang mit den hier gewonnen Ergebnissen erklärt werden. Bei der Veröffentlichung der VASP- und der Mena-Struktur wurden sogenannte  $\varepsilon$ -Determinanten postuliert – sekundäre Bindungsstellen auf der Domäne, welche die charakteristische Substratspezifität einzelner Mitglieder einer Proteinfamilie bestimmen (Aasland *et al.*, 2002). Für VASP wurde eine Gruppe von hydrophoben Resten als Determinante ausgemacht (Ala32, Met54, Phe33; Ball *et al.*, 2000), während für Mena zusätzliche basische Reste als Spezifitätszusatz identifiziert wurden (Arg10, Arg45, Arg51, His56; Prehoda *et al.*, 1999). Beide Determinanten sind durch alle paralogen EVH1-Domänen konserviert. Der Hohlraum, in dem der Ligand Platz finden kann und welcher durch den Schleifenbereich zwischen dem siebten  $\beta$ -Faltblattstrang und der Helix sowie durch den Schleifenbereich zwischen dem ersten und zweiten  $\beta$ -Faltblattstrang bestimmt wird, ist jedoch in den Domänen durch verschiedene Konformationen und Aminosäure-Insertionen unterschiedlich geformt. So ist dieser Bereich in Evl und VASP relativ schmal und flach, während in Mena eine wesentlich tiefere Grube ausgebildet ist. Eine flache Bindungsstelle erschwert die



**Abb. IV.18:** Darstellung der Effekte von Alaninmutationen im prolinreichen Teil von pGolemi auf die Affinität zu den einzelnen Ena/VASP-Mitgliedern. Die Werte sind jeweils auf den größten negativen (rot) oder positiven (grün) Einfluss ( $\pm 100\%$ ) normiert. Mutationen ohne Effekt auf die Bindung sind blau dargestellt.

Anlagerung einer langen Seitenkette an dieser Position des Liganden und erklärt die bessere Bindung der Glu9Ala- und Glu10Ala-Mutanten, da bedingt durch die räumliche Beschränkung der Domäne mit diesen relativ kleinen Seitenketten eine bessere Interaktion erfolgen kann. Auf Grund der *in vitro* gemessenen Verschlechterung der Affinität der PR-Repeats an EVH1-Domänen bei Wegfall der DEL-Reste (Ball *et al.*, 2000) ist es verwunderlich, dass das Homologiemodell für Mena im Komplex mit pGolemi nur Wechselwirkungen für Glu9, nicht jedoch Glu10 zeigt. Hier liegt *in natura* eventuell ein veränderter Bindungsmechanismus vor, der mit der verwendeten Modellierungstechnik nur mangelhaft nachgebildet werden konnte.

Die Verschlechterung der Bindung von PRII ohne DEL-Reste könnte auch einfach im Wegfall von zusätzlichen Kontakten zur Domäne begründet sein. Da Wechselwirkungen mit Polyprolin-Helices im Allgemeinen eher im niedrig affinen Bereich von bis zu 500  $\mu$ M stattfinden (Ball *et al.*, 2002), könnte die Deletion von weiteren Kontakten zu einer Verschlechterung des  $K_{DS}$  in der beschriebenen Größenordnung führen. Eine weitere Möglichkeit wäre eine andere Art von Bindung des pGolemi-Liganden an Evl und VASP-Domänen, die weniger auf die Wechselwirkungen der sauren Reste mit der Domäne angewiesen ist. Die große Zahl der Kontakte dieser sauren Reste aus dem PRII-Repeat zu polaren Resten auf Mena (Kap. IV.3.2) deutet eher auf die letztere Möglichkeit hin.

Die Ergebnisse für den hydrophoben *Patch* auf der Domäne sind jedoch kongruenter: in Übereinstimmung mit der Studie von Ball *et al.* (2000) finden sowohl im Homologiemodell der Mena EVH1-Domäne mit PRII als auch in dem Modell mit pGolemi extensive Kontakte zu einem hydrophoben Bereich um Phe32 etwas oberhalb der hydrophoben Triade statt. Die Konservierung dieser hydrophoben Reste spricht daher nicht unbedingt für eine Besonderheit der PR-VASP-Bindung, sondern eher für ein allgemeines Prinzip der Interaktion zwischen den ActA-Tandemrepeats und den Ena/VASP-Proteinen.

Auch für andere polyprolin-bindende Proteine wurden bereits ähnliche Differenzen in der Bindungsspezifität gefunden, so zum Beispiel für SH3-Domänen (Rickles *et al.*, 1994, Sparks *et al.*, 1996; Cesareni *et al.*, 2002) und WWP/WW-Domänen (Chan *et al.*, 1996, Ramirez-Espain *et al.*, 2007). Diese Unterschiede der Affinität zu verschiedenen

Substraten ermöglichen ein fein abgestimmtes System von Protein-Protein-Wechselwirkungen in der Zelle, mit dem komplexe Regelkreisläufe erst möglich werden.

#### 4.4 Durch Erstellung eines Strukturmodells des pGolemi:P11-Komplexes zeigen sich Optimierungspunkte für P11

Sollte über Fluoreszenz-Spektroskopie tatsächlich eine direkte Bindung zwischen P11 und pGolemi verifiziert werden können, muss die Bindung zwischen den beiden synthetischen Bindungspartnern zunächst durch einige Modifikationen der Sequenz verbessert werden. Vor allem die Homologiemodellierung von P11 und des P11:pGolemi-Komplexes zeigte hier erste Ansatzpunkte auf (Kap. IV.3.3 und IV.3.4).

##### 4.4.1. Wichtige sekundäre Kontakte sollten in das Mimikry aufgenommen werden

Für die Erstellung des Domänenmimikrys wurden exakt zwei bindende Faltblätter aus der Kristallstruktur von Prehoda *et al.* (1999) entnommen. Hierbei wurden jedoch nicht die sekundären Kontakte der Domäne an das Substrat beachtet, die bei allen erstellten Homologiemodellen mit einer intakten Mena-Domäne beobachtet werden konnten (Abb. IV.13). Einer der wichtigsten, vernachlässigten Kontakte scheint hier die Wechselwirkung des „Bindungsankers“ Phe2 mit Lys69 zu sein. Da sich dieser Rest nicht direkt in der Nähe der hydrophoben Triade befindet, wurde er für P11 durch einem starren  $\epsilon$ -Aminohexansäurerest ersetzt, der als gängiger Abstandshalter fürs Proteindesign verwendet wird (Howl *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998), aber keinesfalls die Wechselwirkungen dieses in einem Schleifenbereich zwischen dem fünften und sechsten  $\beta$ -Faltblattstrang gelegenen Restes ersetzen kann. Da Lys69 bei der korrekten Positionierung von Phe2 mitwirkt, könnte ein bindendes Domänenkonstrukt, welches auch Lys69 beinhaltet, einen klassischen Bindungsmechanismus an pGolemi über die konservierten Proline nachbilden. Im erstellten Modell wird diese klassische Bindung durch eine veränderte Form ersetzt, bei welcher der Wegfall von Lys69 zum Teil von Gln28/Gln79 und Asn20/Asn71 kompensiert wird (Kap. IV.3.4)

Auch die zentrale Wechselwirkung des Pro6 ist durch Thr5 ersetzt, was prinzipiell für eine produktive Bindung ausreichen könnte. Da jedoch die Komplexspektren für pGolemi und P11 kein Anzeichen für Bindung aufweisen konnten (Kap. IV.2.2), scheint dieses Modell nur eine theoretische Möglichkeit, nicht jedoch die tatsächliche Wechselwirkung der beiden Komplexpartner untereinander darzustellen.

#### 4.4.2 Die gespannte Konformation bedingt einen alternativen, suboptimalen

##### Bindungsmechanismus

Vermutlich spielt die richtige Konformation des Faltblattes eine wichtige Rolle bei der Herstellung der "korrekten" Bindungsweise mit dem Liganden. Bei der Erstellung des strukturierten Modells von P11 konnte die räumliche Anordnung aus der Kristallstruktur (PDB-Eintrag 1evh) jedoch nur verwirklicht werden, wenn zwei endständige Aminosäuren auf beiden Seiten des ersten  $\beta$ -Faltblatts ihre Faltblattkonformation verlieren. Das zweite Faltblatt ist ohne gebundenen Liganden sehr stark gekrümmt (Kap. IV.3.4). Diese gespannte Konformation bedingt möglicherweise den alternativen Bindungsmechanismus über veränderte Rückgratkonformationen des Peptids mit. In Kombination mit der fehlenden Verankerung des Phe2-Restes könnte diese Spannung ausreichen, um eine hochaffine Bindung zu verhindern.

Die Herausforderung bei der Nachbildung der Bindungsstelle ganzer Domänen liegt in der korrekten räumlichen Anordnung der an der Bindung beteiligten Reste, welche meist nicht sequentiell hintereinander vorliegen. Die entsprechende sterische Konfiguration wird daher oft über chemische, starre Linkergruppen und Zyklisierungen erreicht (Sudarman *et al.*, 2008; Franke *et al.*, 2007, Eichler, 2008). Für das Domänenmimetikum P11 ist jedoch fraglich, ob die verwendeten *Spacer*-Gruppen tatsächlich auch genügen, um die komplette Bindungstasche mit allen sterischen Beschränkungen ausreichend nachzubilden. P11 wurde kombinatorisch aus einer Reihe von sterisch eingeschränkten Peptiden mit Hilfe von kompetitiven ELISA-Versuchen als bester Binder ermittelt. Im Vergleich ist die inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) des besten Binders P11 jedoch immer noch 26mal größer als die der gesamten Mena EVH1-Domäne (Hunke *et al.*, 2007). Dies lässt eventuell auf eine nur geringe Bindungsfähigkeit des synthetischen Peptids schließen. Auf Grund der fehlenden Charakterisierung der Sekundär- und Tertiär-

struktur über CD-Spektroskopie bzw. NMR können allerdings keine Aussagen über eine unerwartete Faltung des Domänenmimetikums getroffen werden, welche eine direkte Bindung verhindern würde.

Die erstellten Homologiemodelle in Kombination mit der Strukturbestimmung von pGolemi weisen zudem auf einen *Induced Fit*-Bindungsmechanismus hin, bei dem beide Partner erst beim Kontakt miteinander die bindende Konformation einnehmen (Kap. IV.1.6.3; Kap. IV.3.2). Es ist offensichtlich, dass bei einem solchen Mechanismus sterische Beschränkungen, die nicht in der direkten Sequenzumgebung der bindenden Reste liegen, eine wichtige Rolle für die Ausbildung der richtigen Konformation spielen. Da bisher keine direkte Bindung von pGolemi an P11 nachgewiesen werden konnte und die gefundene  $IC_{50}$  auch durch unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen erklärt werden kann (Hunke *et al.*, 2007), werden erst nach Fluoreszenzuntersuchungen und der anschließenden Strukturbestimmung Aussagen darüber getroffen werden können, ob das Domänenmimikry auch tatsächlich die Bindungsstelle der Mena EVH1-Domäne für eine hochaffine Bindung hinreichend exakt imitieren kann.

#### 4.5 pGolemi kann zur Aufklärung der Aktinrekrutierung von *Listeria monocytogenes* und der Initiation der Aktinpolymerisierung beitragen

Aufgrund der großen Differenzen in den Bindungsprofilen der drei paralogen Domänen stellt sich die Frage der physiologischen Relevanz dieser Unterschiede in der Zelle. Offensichtlich wird das erste prolinreiche Motiv von ActA am Besten von Evl, mit einer nur wenig verringerten Affinität von Mena und am Schlechtesten von VASP gebunden (4  $\mu$ M, 6  $\mu$ M und 15  $\mu$ M; Holtzman *et al.*, 2007). Bei PRII zeigt Mena eine vergleichbare Affinität zu VASP (17  $\mu$ M und 19  $\mu$ M), Evl wurde in dieser Studie nicht untersucht (Ball *et al.*, 2000). Neben den bedeutenden Unterschieden in der Bindungsstärke scheint auch der Sequenzkontext die Bindung empfindlich zu beeinflussen; so wurde durch die Konstruktion einer Chimäre aus dem Kern-Bindungsmotiv des vierten PR und der umgebenden Sequenz aus dem PRII eine Verdoppelung der Affinität an EVH1-Domänen erreicht (Niebuhr *et al.*, 1997). Es konnte bisher noch nicht erörtert werden, ob jedes der

PR-Motive für die Bindung an ein EVH1-Paralog optimiert ist oder ob diese Tandemrepeats nur die Konsensussequenz für die Bindung an möglichst viele EVH1-Domänen darstellen. In diesem Fall wäre nicht die Art des Adapterproteins von Relevanz, sondern nur die Quantität der Domänen, um eine möglichst schnelle Ausbildung des Kometenschwanzes und so eine maximale Steigerung der Aktinpolymerisierung herbei zu führen. Für die letztere Möglichkeit spricht die vollständige Beladung der prolinreichen Motive aus ActA mit vier EVH1-haltigen Proteinen, wie durch analytische Ultrazentrifugationsmessungen belegt werden konnte (Machner *et al.*, 2001). Zudem besteht eine direkte Abhängigkeit der Polymerisierungsgeschwindigkeit des Aktinschweifes der intrazellulären Listerien von der Menge der vorhandenen Tandemrepeats im ActA-Protein (Smith *et al.*, 1996).

Interessanterweise führt jedoch die Injektion von pGolemi, welches spezifisch an Mena bindet, in einem zellfreien *Xenopus*-Motilitäts-Assay für *Listeria monocytogenes* zu erheblichen Geschwindigkeitsvariationen und unterbrochener Schweifbildung. Dieser Effekt konnte bei Injektion des unspezifischen PRI-Motivs nicht beobachtet werden (Golemi-Kotra *et al.*, 2004), was eher auf eine paralog-spezifische Aufgabenverteilung hindeutet.

Obwohl viele Details der Aktinpolymerisierung bekannt sind, konnten bisher die genauen Aufgaben für die einzelnen Ena/VASP-Familienmitglieder in der Aktinnukleation noch nicht ermittelt werden (Auerbuch *et al.*, 2003). Es wurde jedoch eine Reihe von differentiellen Regulationsmöglichkeiten für die einzelnen Mitglieder gefunden, die auf ein fein abgestimmtes Regelwerk für die Polymerisierung hinweisen. So wird VASP von cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen umgesetzt (Butt *et al.*, 1994; Halbrugge und Walter, 1989). Ena, Mena und Evl werden wie VASP serin/threonin-phosphoryliert, zudem werden Ena und Mena in der neuronalen Isoform tyrosin-phosphoryliert (Comer *et al.*, 1998; Bodenmiller *et al.*, 2007; Dephore *et al.*, 2008). Mena bindet ferner auch an die Src- und Abl-Kinase und scheint eine Effektor-Funktion für Abl zu übernehmen (Gertler *et al.*, 1996; Wills *et al.*, 1999).

Erst kürzlich wurde eine weitere Regulationsmöglichkeit von Mena durch das potentielle Tumor-Suppressor-Protein Tes nachgewiesen (Boeda *et al.*, 2007). Die dritte LIM-Domäne

dieses Proteins bindet kompetitiv an die hydrophobe Triade der Mena EVH1-Domäne, nicht jedoch an Evl oder VASP, wobei die Hauptkontakte über ein  $\pi$ -Stacking des His365 zu Phe77 und zwei Seitenkettenwasserstoffbrücken von Asn366 zu Trp23 stattfinden. Somit wird die Bindungsstelle für FP4-Motive blockiert. Neben der hydrophoben Triade wird eine hydrophobe Region von Tes kontaktiert, die bereits als  $\varepsilon$ -Determinante von VASP diskutiert wurde (Ball *et al.*, 2000). Interessanterweise ist die gemessene Affinität der Bindung der dritten LIM-Domäne von Tes zu Mena in der o. g. Studie doppelt so hoch wie die des natürlichen Substrates Zyxin, einem Protein des Cytoskeletts. Durch eine kompetitive Hemmung der Bindung von Mena an Zyxin und Vinculin und somit fehlender Lokalisierung des Proteins an den Lamellipodien könnte die Aktinpolymerisierung herunter reguliert oder vollständig unterbrochen werden.

Diese Beispiele für die Regulation der Ena/VASP-Proteine in der Zelle zeigen eine bisher nicht vollständig untersuchte Komplexität der Signalwege, welche zur Aktinpolymerisierung führen, auf. Vor allem die genauen molekularen Details der Aktinpolymerisierungsmaschinerie in den Lamellipodien der Zelle sowie deren Rekrutierung durch den intrazellulären Krankheitserreger *Listeria monocytogenes* wurden bisher noch nicht erschöpfend untersucht. Hier können Strukturen der einzelnen, paralogen Domänen im Komplex mit längeren Peptidabschnitten des Proteins ActA den Ausgangspunkt für ein besseres Verständnis bieten.

Anhand der in dieser Arbeit bestimmten Struktur des ersten paralog-spezifischen Mena EVH1-bindenden Proteins und den Ergebnissen der komparativen Molekülmodellierung können weitere, spezifische Miniaturproteine für alle Mitglieder der Ena/VASP-Familie erstellt werden. Trotz der Letalität von Ena/VASP-Doppelknockouts im Embryonalstadium von Mäusen (Lanier *et al.*, 1999), könnten so die Folgen einer spezifischen Depletion eines Paralogs auf die Zelle untersucht werden. Dadurch könnte in ähnlicher Weise, wie schon die Effekte der Injektion von prolinreichen Sequenzen auf die Motilität von Listerien untersucht wurde (Southwick und Purich, 1994), mit Hilfe einer Injektion dieser Miniaturproteine mehr über die Aufgaben der einzelnen Mitglieder bei der Aktinpolymerisierung *in vivo* sowie bei der Ausbildung des Kometenschwanzes der Listerien erfahren werden.



Mit einer weiteren Optimierung der Bindung von P11 an prolinreiche Sequenzen sind sowohl für pGolemi als auch für dieses Domänenmimikry überdies therapeutische Optionen denkbar. Hierfür können erneut die Struktur von pGolemi und die erstellten Homologiemodelle als Ausgangspunkt hierfür dienen. Sowohl ActA-defiziente Listerien als auch die Listerien in Zellen, in welche pGolemi injiziert wurde, weisen eine stark gekrümmte und verlangsamte Bewegungsart auf bzw. bleiben komplett unbeweglich und sind daher nicht infektiös (Pistor *et al.*, 1995; Niebuhr *et al.*, 1997; Lasa *et al.*, 1997; Golemi-Kotra *et al.*, 2004). So eröffnet sich eine neue Therapiemöglichkeit für Listeriose, welche in immungeschwächten Personen zu einem letalen Verlauf führen und durch steigende Resistenz der Stämme über konventionelle Antibiotika schlecht behandelt werden kann (Mead *et al.*, 1999; Gandhi und Chikindas, 2007; Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Bei einer Letalität von 30 % nach einer Listerieninfektion (Altekruse *et al.*, 1997) ist solch ein alternativer Behandlungsansatz dringend nötig.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

EVH1-Domänen sind polyprolinbindende Domänen, welche in einer Vielzahl von Adapterproteinen vorkommen; unter Anderem auch in Ena/VASP-Proteinen, deren Aufgaben in der Umgestaltung des Aktin-Skeletts der Zelle und der korrekten Führung der Axonfortsätze liegen. Ena/VASP-Proteine haben eine konservierte Domänenzusammensetzung mit einer aminoterminalen EVH1-Domäne, über welche die korrekte Lokalisierung der Adapterproteine vermittelt wird, einem prolinreichen Abschnitt und eine EVH2-Domäne. Die Wechselwirkung eines Transmembran-Proteins des Krankheitserregers *Listeria monocytogenes* mit diesen EVH1-Domänen ist essentiell für die Rekrutierung des Aktinskeletts in der Wirtszelle, welche wiederum die Grundlage für die Infektivität dieses Pathogens ist.

In dieser Arbeit wurde die Struktur eines synthetischen, hochaffinen Mena EVH1-Liganden mit Hilfe der NMR-Spektroskopie gelöst und Strukturmodelle von drei verschiedenen EVH1-Domänen mit pGolemi und einem natürlichen Liganden erstellt. Die Struktur des Peptids entspricht der Faltung von pankreatischen Peptiden, weist aber im Aminoterminus grundlegende Unterschiede in der Konformation und der Stabilisierung des charakteristischen hydrophoben Kerns auf. Die erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass das Wechselspiel zwischen räumlicher Fixierung und Flexibilität für die hohe Affinität an die Mena EVH1-Domäne verantwortlich ist. In Kombination mit den erstellten Homologiemodellen und früheren Arbeiten konnten zusätzliche Bindungs-determinanten der EVH1-Domänen aufgedeckt werden und zudem starke Hinweise für einen nicht-klassischen Bindungsmechanismus für pGolemi unter Beteiligung der amphipathischen Helix gewonnen werden. Zusätzlich wurde ein Strukturmodell eines synthetischen Domänenmimikrys angefertigt, das auf eine suboptimale oder nichtproduktive Bindung an pGolemi hinweist. Ähnliche Ergebnisse wurden über NMR-spektroskopische Untersuchung des Komplexes erhalten.

Diese Erkenntnisse werden die Erstellung von weiteren hochaffinen und paralog-spezifischen EVH1-Liganden erheblich vereinfachen. Sie können als Grundlage für die Untersuchung der molekularen Aufgaben dieser Domänen in der Zelle dienen und so zu einem besseren Verständnis der Aktinpolymerisierung beitragen.

---

## LITERATURVERZEICHNIS

- Aasland,R., Abrams,C., Ampe,C., Ball,L.J., Bedford,M.T., Cesareni,G., Gimona,M., Hurley,J.H., Jarchau,T., Lehto,V.P., Lemmon,M.A., Linding,R., Mayer,B.J., Nagai,M., Sudol,M., Walter,U., and Winder,S.J. (2002). Normalization of nomenclature for peptide motifs as ligands of modular protein domains. *FEBS Lett.* **513**, 141-144.
- Adzhubei,A.A. and Sternberg,M.J. (1993). Left-handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins. *J Mol Biol* **229**, 472-493.
- Ahern-Djamali,S.M., Bachmann,C., Hua,P., Reddy,S.K., Kastenmeier,A.S., Walter,U., and Hoffmann,F.M. (1999). Identification of profilin and src homology 3 domains as binding partners for *Drosophila* enabled. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **96**, 4977-4982.
- Ahern-Djamali,S.M., Comer,A.R., Bachmann,C., Kastenmeier,A.S., Reddy,S.K., Beckerle,M.C., Walter,U., and Hoffmann,F.M. (1998). Mutations in *Drosophila* enabled and rescue by human vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) indicate important functional roles for Ena/VASP homology domain 1 (EVH1) and EVH2 domains. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2157-2171.
- Altekruse,S.F., Cohen,M.L., and Swerdlow,D.L. (1997). Emerging foodborne diseases. *Emerg. Infect. Dis.* **3**, 285-293.
- Alvarez-Dominguez,C., Vazquez-Boland,J.A., Carrasco-Marin,E., Lopez-Mato,P., and Leyva-Cobian,F. (1997). Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infect. Immun.* **65**, 78-88.
- Aue,W.P., Bartholdi,E., and Ernst,R.R. (1976). Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *Journal of Chemical Physics* **64**, 2229-2246.
- Auerbuch,V., Loureiro,J.J., Gertler,F.B., Theriot,J.A., and Portnoy,D.A. (2003). Ena/VASP proteins contribute to *Listeria monocytogenes* pathogenesis by controlling temporal and spatial persistence of bacterial actin-based motility. *Mol. Microbiol.* **49**, 1361-1375.
- Bachmann,C., Fischer,L., Walter,U., and Reinhard,M. (1999). The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J. Biol. Chem.* **274**, 23549-23557.
- Ball,L.J., Jarchau,T., Oschkinat,H., and Walter,U. (2002). EVH1 domains: structure, function and interactions. *FEBS Lett.* **513**, 45-52.
- Ball,L.J., Kuhne,R., Hoffmann,B., Hafner,A., Schmieder,P., Volkmer-Engert,R., Hof,M., Wahl,M., Schneider-Mergener,J., Walter,U., Oschkinat,H., and Jarchau,T. (2000). Dual epitope recognition by the VASP EVH1 domain modulates polyproline ligand specificity and binding affinity. *EMBO J.* **19**, 4903-4914.
- Ball,L.J., Kuhne,R., Schneider-Mergener,J., and Oschkinat,H. (2005). Recognition of Proline-Rich Motifs by Protein-Protein-Interaction Domains. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **44**, 2852-2869.

- Bax, A. und Davis, D. G. MLEV-17-Based Two-Dimensional Homonuclear Magnetization Transfer Spectroscopy. *J. Magn Reson.* 65[2], 355-360. 11-7-1985.
- Bear, J.E., Loureiro, J.J., Libova, I., Fassler, R., Wehland, J., and Gertler, F.B. (2000). Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell* 101, 717-728.
- Bear, J.E., Svitkina, T.M., Krause, M., Schafer, D.A., Loureiro, J.J., Strasser, G.A., Maly, I.V., Chaga, O.Y., Cooper, J.A., Borisy, G.G., and Gertler, F.B. (2002). Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* 109, 509-521.
- Beauregard, K.E., Lee, K.D., Collier, R.J., and Swanson, J.A. (1997). pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J Exp. Med.* 186, 1159-1163.
- Berndt, K.D., Guntert, P., and Wuthrich, K. (1996). Conformational sampling by NMR solution structures calculated with the program DIANA evaluated by comparison with long-time molecular dynamics calculations in explicit water. *Proteins* 24, 304-313.
- Blundell, T.L., Pitts, J.E., Tickle, I.J., Wood, S.P., and Wu, C.W. (1981). X-ray analysis (1.4-Å resolution) of avian pancreatic polypeptide: Small globular protein hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 78, 4175-4179.
- Bodenhausen, G., Kogler, H., and Ernst, R.R. (1984). Selection of Coherence-Transfer Pathways in NMR Pulse Experiments. *J. Magn Reson.* 58, 370-388.
- Bodenmiller, B., Mueller, L.N., Pedrioli, P.G., Pflieger, D., Junger, M.A., Eng, J.K., Aebersold, R., and Tao, W.A. (2007). An integrated chemical, mass spectrometric and computational strategy for (quantitative) phosphoproteomics: application to *Drosophila melanogaster* Kc167 cells. *Mol. Biosyst.* 3, 275-286.
- Boeda, B., Briggs, D.C., Higgins, T., Garvalov, B.K., Fadden, A.J., McDonald, N.Q., and Way, M. (2007). Tes, a specific Mena interacting partner, breaks the rules for EVH1 binding. *Mol. Cell* 28, 1071-1082.
- Boukhelifa, M., Parast, M.M., Bear, J.E., Gertler, F.B., and Otey, C.A. (2004). Palladin is a novel binding partner for Ena/VASP family members. *Cell Motil. Cytoskeleton* 58, 17-29.
- Braunschweiler, L. and Ernst, R.R. (1983). Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* (1969) 53, 521-528.
- Brindle, N.P., Holt, M.R., Davies, J.E., Price, C.J., and Critchley, D.R. (1996). The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin. *Biochem. J.* 318 (Pt 3), 753-757.
- Brooks, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S., and Karplus, M. (1983). CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry* 4, 187-217.
- Bundschuh, K., Walter, U., and Schuh, K. (2007). Getting a first clue about SPRED functions. *Bioessays* 29, 897-907.
- Butt, E., Abel, K., Krieger, M., Palm, D., Hoppe, V., Hoppe, J., and Walter, U. (1994). cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J. Biol. Chem.* 269, 14509-14517.

- Cameron,L.A., Svitkina,T.M., Vignjevic,D., Theriot,J.A., and Borisy,G.G. (2001). Dendritic organization of actin comet tails. *Curr. Biol* *11*, 130-135.
- Cavanagh,J., Fairbrother,W.J., Palmer III,A.G., Skelton,N.J., and Rance,M. (2007). Protein NMR Spectroscopy. Principles and Practice. (San Diego: Academic Press).
- Cesareni,G., Panni,S., Nardelli,G., and Castagnoli,L. (2002). Can we infer peptide recognition specificity mediated by SH3 domains? *FEBS Lett.* *513*, 38-44.
- Chakraborty,T., Ebel,F., Domann,E., Niebuhr,K., Gerstel,B., Pistor,S., Temm-Grove,C.J., Jockusch,B.M., Reinhard,M., Walter,U., and . (1995). A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J.* *14*, 1314-1321.
- Chan,D.C., Bedford,M.T., and Leder,P. (1996). Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. *EMBO J.* *15*, 1045-1054.
- Clore,G.M. and Gronenborn,A.M. (1998). New methods of structure refinement for macromolecular structure determination by NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 5891-5898.
- Cobos,E.S., Pisabarro,M.T., Vega,M.C., Lacroix,E., Serrano,L., Ruiz-Sanz,J., and Martinez,J.C. (2004). A Miniprotein Scaffold Used to Assemble the Polyproline II Binding Epitope Recognized by SH3 Domains. *Journal of Molecular Biology* *342*, 355-365.
- Comer,A.R., hern-Djamali,S.M., Juang,J.L., Jackson,P.D., and Hoffmann,F.M. (1998). Phosphorylation of Enabled by the *Drosophila* Abelson Tyrosine Kinase Regulates the In Vivo Function and Protein-Protein Interactions of Enabled. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 152-160.
- Cornilescu,G., Delaglio,F., and Bax,A. (1999). Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR* *13*, 289-302.
- Cowan,P.M. and McGavin,S.T.E.W. (1955). Structure of Poly-L-Proline. *Nature* *176*, 501-503.
- Creamer,T.P. (1998). Left-handed polyproline II helix formation is (very) locally driven. *Proteins* *33*, 218-226.
- Cubellis,M.V., Caillez,F., Blundell,T.L., and Lovell,S.C. (2005). Properties of polyproline II, a secondary structure element implicated in protein-protein interactions. *Proteins* *58*, 880-892.
- Dabiri,G.A., Sanger,J.M., Portnoy,D.A., and Southwick,F.S. (1990). *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* *87*, 6068-6072.
- Darden,T., York,D., and Pedersen,L. (1993). Particle mesh Ewald: An N [center-dot] log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics* *98*, 10089-10092.
- Dephoure,N., Zhou,C., Vill+@n,J., Beausoleil,S.A., Bakalarski,C.E., Elledge,S.J., and Gygi,S.P. (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 10762-10767.
- DeRome, A. E. und Williamson, M. P. Rapid-Pulsing Artifacts in Double-Quantum-Filtered COSY. *J.Magn Reson.* *88*[1], 177-185. 28-11-1989.

- Domann,E., Wehland,J., Rohde,M., Pistor,S., Hartl,M., Goebel,W., Leimeister-Wachter,M., Wuenscher,M., and Chakraborty,T. (1992). A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J* 11, 1981-1990.
- Eichler,J. (2008). Peptides as protein binding site mimetics. *Current Opinion in Chemical Biology* 12, 707-713.
- Ellman,G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
- Ermekova,K.S., Zambrano,N., Linn,H., Minopoli,G., Gertler,F., Russo,T., and Sudol,M. (1997). The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of *Drosophila* Enabled. *J Biol Chem.* 272, 32869-32877.
- Essmann,U., Perera,L., Berkowitz,M., Darden,T., Lee,H., and Pedersen,L. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics* 103, 8577-8593.
- Fedorov,A.A., Fedorov,E., Gertler,F., and Almo,S.C. (1999). Structure of EVH1, a novel proline-rich ligand-binding module involved in cytoskeletal dynamics and neural function. *Nat. Struct. Biol.* 6, 661-665.
- Ferron,F., Rebowski,G., Lee,S.H., and Dominguez,R. (2007). Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *EMBO J* 26, 4597-4606.
- Franke,R., Hirsch,T., Overwin,H., and Eichler,J. (2007). Synthetic mimetics of the CD4 binding site of HIV-1 gp120 for the design of immunogens. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 46, 1253-1255.
- Gaillard,J.L., Berche,P., Frehel,C., Gouin,E., and Cossart,P. (1991). Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 65, 1127-1141.
- Gaillard,J.L., Berche,P., Mounier,J., Richard,S., and Sansonetti,P. (1987). In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* 55, 2822-2829.
- Gambaryan,S., Hauser,W., Kobsar,A., Glazova,M., and Walter,U. (2001). Distribution, cellular localization, and postnatal development of VASP and Mena expression in mouse tissues. *Histochem. Cell Biol* 116, 535-543.
- Gandhi,M. and Chikindas,M.L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* 113, 1-15.
- Gertler,F.B., Comer,A.R., Juang,J.L., Ahern,S.M., Clark,M.J., Liebl,E.C., and Hoffmann,F.M. (1995). Enabled, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the *Drosophila* Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties. *Genes Dev.* 9, 521-533.
- Gertler,F.B., Doctor,J.S., and Hoffmann,F.M. (1990). Genetic suppression of mutations in the *Drosophila* abl proto-oncogene homolog. *Science* 248, 857-860.
- Gertler,F.B., Niebuhr,K., Reinhard,M., Wehland,J., and Soriano,P. (1996). Mena, a relative of VASP and *Drosophila* Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* 87, 227-239.

- Glover,I., Haneef,I., Pitts,J., Wood,S., Moss,D., Tickle,I., and Blundell,T. (1983). Conformational flexibility in a small globular hormone: x-ray analysis of avian pancreatic polypeptide at 0.98-Å resolution. *Biopolymers* **22**, 293-304.
- Goldberg,M.B. (2001). Actin-Based Motility of Intracellular Microbial Pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 595-626.
- Golemi-Kotra,D., Mahaffy,R., Footer,M.J., Holtzman,J.H., Pollard,T.D., Theriot,J.A., and Schepartz,A. (2004). High affinity, paralog-specific recognition of the Mena EVH1 domain by a miniature protein. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 4-5.
- Gray,M.L. and Killinger,A.H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **30**, 309-382.
- Gronwald,W. and Kalbitzer,H.R. (2004). Automated structure determination of proteins by NMR spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **44**, 33-96.
- Gruenheid,S. and Finlay,B.B. (2003). Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature* **422**, 775-781.
- Halbrugge,M. and Walter,U. (1989). Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur. J. Biochem.* **185**, 41-50.
- Hodges,A.M. and Schepartz,A. (2007). Engineering a Monomeric Miniature Protein. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 11024-11025.
- Hof,H., Nichterlein,T., and Kretschmar,M. (1997). Management of listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 345-357.
- Holtzman,J.H., Woronowicz,K., Golemi-Kotra,D., and Schepartz,A. (2007). Miniature protein ligands for EVH1 domains: interplay between affinity, specificity, and cell motility. *Biochemistry* **46**, 13541-13553.
- Howl,J., Langel,U., Hawtin,S.R., Valkna,A., Yarwood,N.J., Saar,K., and Wheatley,M. (1997). Chimeric strategies for the rational design of bioactive analogs of small peptide hormones. *FASEB J.* **11**, 582-590.
- Hunke,C., Hirsch,T., and Eichler,J. (2006). Structure-based synthetic mimicry of discontinuous protein binding sites: inhibitors of the interaction of Mena EVH1 domain with proline-rich ligands. *Chembiochem.* **7**, 1258-1264.
- Hutchinson,E.G. and Thornton,J.M. (1994). A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins. *Protein Sci.* **3**, 2207-2216.
- Huttelmaier,S., Harbeck,B., Steffens,O., Messerschmidt,T., Illenberger,S., and Jockusch,B.M. (1999). Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP. *FEBS Lett.* **451**, 68-74.
- Ichetovkin,I., Grant,W., and Condeelis,J. (2002). Cofilin Produces Newly Polymerized Actin Filaments that Are Preferred for Dendritic Nucleation by the Arp2/3 Complex. *Current Biology* **12**, 79-84.
- Ilsey,J.L., Sudol,M., and Winder,S.J. (2002). The WW domain: Linking cell signalling to the membrane cytoskeleton. *Cellular Signalling* **14**, 183-189.



- Iwatsuki,M., Tomoda,H., Uchida,R., Gouda,H., Hirono,S., and +imura,S. (2006). Lariatins, Antimycobacterial Peptides Produced by *Rhodococcus* sp. K01Γ€B0171, Have a Lasso Structure. *Journal of the American Chemical Society* *128*, 7486-7491.
- Jeener,J., Meier,B.H., Bachmann,P., and Ernst,R.R. (1979). Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *Journal of Chemical Physics* *71*, 4546-4553.
- Joseph,B. and Goebel,W. (2007). Life of *Listeria monocytogenes* in the host cells' cytosol. *Microbes. Infect.* *9*, 1188-1195.
- Jurt,S., Aemissegger,A., Guntert,P., Zerbe,O., and Hilvert,D. (2006). A photoswitchable miniprotein based on the sequence of avian pancreatic polypeptide. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *45*, 6297-6300.
- Kay,B.K., Williamson,M.P., and Sudol,M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* *14*, 231-241.
- Kelly,M.A., Chellgren,B.W., Rucker,A.L., Troutman,J.M., Fried,M.G., Miller,A.F., and Creamer,T.P. (2001). Host-guest study of left-handed polyproline II helix formation. *Biochemistry* *40*, 14376-14383.
- Kimmel,J.R., Hayden,L.J., and Pollock,H.G. (1975). Isolation and characterization of a new pancreatic polypeptide hormone. *J. Biol. Chem.* *250*, 9369-9376.
- Kirkpatrick,S., Gelatt,C.D., Jr., and Vecchi,M.P. (1983). Optimization by Simulated Annealing. *Science* *220*, 671-680.
- Knappe,T.A., Linne,U., Zirah,S.ü., Rebuffat,S., Xie,X., and Marahiel,M.A. (2008). Isolation and Structural Characterization of Capistruin, a Lasso Peptide Predicted from the Genome Sequence of *Burkholderia thailandensis* E264. *Journal of the American Chemical Society* *130*, 11446-11454.
- Kocks,C., Gouin,E., Tabouret,M., Berche,P., Ohayon,H., and Cossart,P. (1992). *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* *68*, 521-531.
- Kofler,M.M. and Freund,C. (2006). The GYF domain. *FEBS J* *273*, 245-256.
- Krause,M., Dent,E.W., Bear,J.E., Loureiro,J.J., and Gertler,F.B. (2003). Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *19*, 541-564.
- Krause,M., Leslie,J.D., Stewart,M., Lafuente,E.M., Valderrama,F., Jagannathan,R., Strasser,G.A., Robinson,D.A., Liu,H., Way,M., Yaffe,M.B., Boussiotis,V.A., and Gertler,F.B. (2004). Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. *Dev. Cell* *7*, 571-583.
- Krieger,E., Darden,T., Nabuurs,S.B., Finkelstein,A., and Vriend,G. (2004). Making optimal use of empirical energy functions: force-field parameterization in crystal space. *Proteins* *57*, 678-683.
- Krieger,E., Koraimann,G., and Vriend,G. (2002). Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA--a self-parameterizing force field. *Proteins* *47*, 393-402.
- Krieger,E., Nielsen,J.E., Spronk,C.A., and Vriend,G. (2006). Fast empirical pKa prediction by Ewald summation. *J. Mol. Graph. Model.* *25*, 481-486.

- Krugmann,S., Jordens,I., Gevaert,K., Driessens,M., Vandekerckhove,J., and Hall,A. (2001). Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr. Biol* *11*, 1645-1655.
- Kuszewski,J., Gronenborn,A.M., and Clore,G.M. (1996). Improving the quality of NMR and crystallographic protein structures by means of a conformational database potential derived from structure databases. *Protein Sci.* *5*, 1067-1080.
- Kuszewski,J. and Clore,G.M. (2000). Sources of and Solutions to Problems in the Refinement of Protein NMR Structures against Torsion Angle Potentials of Mean Force. *Journal of Magnetic Resonance* *146*, 249-254.
- Kuszewski,J., Gronenborn,A.M., and Clore,G.M. (1997). Improvements and Extensions in the Conformational Database Potential for the Refinement of NMR and X-ray Structures of Proteins and Nucleic Acids. *Journal of Magnetic Resonance* *125*, 171-177.
- Lanier, Lorene M., Gates, Monte A., Witke, Walter, Menzies, A. Sheila, Wehman, Ann M., Macklis, Jeffrey D., Kwiatkowski, David, Soriano, Philippe und Gertler, Frank B. Mena Is Required for Neurulation and Commissure Formation. *22[2]*, 313-325. 1-2-1999.
- Lasa,I., Gouin,E., Goethals,M., Vancompernelle,K., David,V., Vandekerckhove,J., and Cossart,P. (1997). Identification of two regions in the N-terminal domain of ActA involved in the actin comet tail formation by *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* *16*, 1531-1540.
- Laurent,V., Loisel,T.P., Harbeck,B., Wehman,A., Grobe,L., Jockusch,B.M., Wehland,J., Gertler,F.B., and Carlier,M.F. (1999). Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* *144*, 1245-1258.
- Lecuit,M. (2007). Human listeriosis and animal models. *Microbes. Infect.* *9*, 1216-1225.
- Lee,J.H., Lim,S.K., Huh,S.H., Lee,D., and Lee,W. (1998). Solution structures of the melanocyte-stimulating hormones by two-dimensional NMR spectroscopy and dynamical simulated-annealing calculations. *Eur. J. Biochem.* *257*, 31-40.
- Loisel,T.P., Boujemaa,R., Pantaloni,D., and Carlier,M.F. (1999). Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* *401*, 613-616.
- Lovell,S.C., Davis,I.W., Arendall,W.B., III, de Bakker,P.I., Word,J.M., Prisant,M.G., Richardson,J.S., and Richardson,D.C. (2003). Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins* *50*, 437-450.
- Machner,M.P., Urbanke,C., Barzik,M., Otten,S., Sechi,A.S., Wehland,J., and Heinz,D.W. (2001). ActA from *Listeria monocytogenes* can interact with up to four Ena/VASP homology 1 domains simultaneously. *J Biol Chem.* *276*, 40096-40103.
- Mayer,B.J. (2001). SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci* *114*, 1253-1263.
- Mead,P.S., Slutsker,L., Dietz,V., McCaig,L.F., Bresee,J.S., Shapiro,C., Griffin,P.M., and Tauxe,R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* *5*, 607-625.
- Mullins,R.D., Heuser,J.A., and Pollard,T.D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* *95*, 6181-6186.

- Naisbitt,S., Kim,E., Tu,J.C., Xiao,B., Sala,C., Valtschanoff,J., Weinberg,R.J., Worley,P.F., and Sheng,M. (1999). Shank, a Novel Family of Postsynaptic Density Proteins that Binds to the NMDA Receptor/PSD-95/GKAP Complex and Cortactin. *Neuron* *23*, 569-582.
- Niebuhr,K., Ebel,F., Frank,R., Reinhard,M., Domann,E., Carl,U.D., Walter,U., Gertler,F.B., Wehland,J., and Chakraborty,T. (1997). A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO J.* *16*, 5433-5444.
- Nilges,M. (1993). A calculation strategy for the structure determination of symmetric dimers by 1H NMR. *Proteins* *17*, 297-309.
- Nilges,M., Kuszewski,J., and Brunger A.T. (1991). Sampling properties of simulated annealing and distance geometry. In *Computational Aspects of the Study of Biological Macromolecules by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Hoch J.C., F.M.Poulsen, and C.Redfield, eds. (New York: Plenum Press), pp. 451-455.
- Notredame,C., Higgins,D.G., and Heringa,J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* *302*, 205-217.
- Nygaard,R., Nielbo,S., Schwartz,T.W., and Poulsen,F.M. (2006). The PP-fold solution structure of human polypeptide YY and human PYY3-36 as determined by NMR. *Biochemistry* *45*, 8350-8357.
- Palmer,A.G., Williams,J., and McDermott,A. (1996). Nuclear Magnetic Resonance Studies of Biopolymer Dynamics. *The Journal of Physical Chemistry* *100*, 13293-13310.
- Pantaloni,D., Le,C.C., and Carlier,M.F. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science* *292*, 1502-1506.
- Pawson,T. and Nash,P. (2003). Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* *300*, 445-452.
- Pearson,M.A., Reczek,D., Bretscher,A., and Karplus,P.A. (2000). Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* *101*, 259-270.
- Piotto,M., Saudek,V., and Sklenar,V. (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* *2*, 661-665.
- Pistor,S., Chakraborty,T., Walter,U., and Wehland,J. (1995). The bacterial actin nucleator protein ActA of *Listeria monocytogenes* contains multiple binding sites for host microfilament proteins. *Curr. Biol.* *5*, 517-525.
- Pornillos,O., Alam,S.L., Davis,D.R., and Sundquist,W.I. (2002). Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein. *Nat Struct Mol Biol* *9*, 812-817.
- Portnoy,D.A., Auerbuch,V., and Glomski,I.J. (2002). The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J Cell Biol* *158*, 409-414.
- Powell,M.J.D. (1977). Restart Procedures for Conjugate Gradient Method. *Mathematical Programming* *12*, 241-254.

- Prehoda, K.E., Lee, D.J., and Lim, W.A. (1999). Structure of the enabled/VASP homology 1 domain-peptide complex: a key component in the spatial control of actin assembly. *Cell* **97**, 471-480.
- Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C., and Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* **7**, 95-99.
- Ramirez-Espain, X., Ruiz, L., Martin-Malpartida, P., Oschkinat, H., and Macias, M.J. (2007). Structural Characterization of a New Binding Motif and a Novel Binding Mode in Group 2 WW Domains. *Journal of Molecular Biology* **373**, 1255-1268.
- Rath, A., Davidson, A.R., and Deber, C.M. (2005). The structure of "unstructured" regions in peptides and proteins: role of the polyproline II helix in protein folding and recognition. *Biopolymers* **80**, 179-185.
- Rehm, T., Huber, R., and Holak, T.A. (2002). Application of NMR in structural proteomics: screening for proteins amenable to structural analysis. *Structure* **10**, 1613-1618.
- Reinhard, M., Halbrugge, M., Scheer, U., Wiegand, C., Jockusch, B.M., and Walter, U. (1992). The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *EMBO J.* **11**, 2063-2070.
- Reinhard, M., Jouvenal, K., Tripier, D., and Walter, U. (1995). Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 7956-7960.
- Reinhard, M., Rudiger, M., Jockusch, B.M., and Walter, U. (1996). VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett.* **399**, 103-107.
- Renfranz, P.J. and Beckerle, M.C. (2002). Doing (F/L)PPPPs: EVH1 domains and their proline-rich partners in cell polarity and migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 88-103.
- Rickles, R.J., Botfield, M.C., Weng, Z., Taylor, J.A., Green, O.M., Brugge, J.S., and Zoller, M.J. (1994). Identification of Src, Fyn, Lyn, PI3K and Abl SH3 domain ligands using phage display libraries. *EMBO J.* **13**, 5598-5604.
- Rosengren, K.J., Clark, R.J., Daly, N.L., Goransson, U., Jones, A., and Craik, D.J. (2003). Microcin J25 Has a Threaded Sidechain-to-Backbone Ring Structure and Not a Head-to-Tail Cyclized Backbone. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 12464-12474.
- Rottner, K., Behrendt, B., Small, J.V., and Wehland, J. (1999). VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat. Cell Biol.* **1**, 321-322.
- Rubin, G.M., Yandell, M.D., Wortman, J.R., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C.R., Hariharan, I.K., Fortini, M.E., Li, P.W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J.M., Henikoff, S., Skupski, M.P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M.S., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, S.E., Chervitz, S.A., Coates, D., Cravchik, A., Gabrielian, A., Galle, R.F., Gelbart, W.M., George, R.A., Goldstein, L.S., Gong, F., Guan, P., Harris, N.L., Hay, B.A., Hoskins, R.A., Li, J., Li, Z., Hynes, R.O., Jones, S.J., Kuehl, P.M., Lemaitre, B., Littleton, J.T., Morrison, D.K., Mungall, C., O'Farrell, P.H., Pickeral, O.K., Shue, C., Vossell, L.B., Zhang, J., Zhao, Q., Zheng, X.H., Zhong, F., Zhong, W., Gibbs, R., Venter, J.C., Adams, M.D., and Lewis, S. (2000). Comparative Genomics of the Eukaryotes. *Science* **287**, 2204-2215.

- Rucker,A.L., Pager,C.T., Campbell,M.N., Qualls,J.E., and Creamer,T.P. (2003). Host-guest scale of left-handed polyproline II helix formation. *Proteins* *53*, 68-75.
- Rutledge,S.E., Volkman,H.M., and Schepartz,A. (2003). Molecular recognition of protein surfaces: high affinity ligands for the CBP KIX domain. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 14336-14347.
- Saraste,M. and Hyvönen,M. (1995). Pleckstrin homology domains: a fact file. *Current Opinion in Structural Biology* *5*, 403-408.
- Schwieters,C.D., Kuszewski,J.J., Tjandra,N., and Clore,G.M. (2003). The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. *J. Magn Reson.* *160*, 65-73.
- Schwieters,C.D., Kuszewski,J.J., and Marius Clore,G. (2006). Using Xplor-NIH for NMR molecular structure determination. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* *48*, 47-62.
- Sheehan,B., Kocks,C., Dramsi,S., Gouin,E., Klarsfeld,A.D., Mengaud,J., and Cossart,P. (1994). Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *192*, 187-216.
- Shen,Y., Naujokas,M., Park,M., and Ireton,K. (2000). InlB-Dependent Internalization of *Listeria* Is Mediated by the Met Receptor Tyrosine Kinase. *Cell* *103*, 501-510.
- Shi,Z., Olson,C.A., Rose,G.D., Baldwin,R.L., and Kallenbach,N.R. (2002). Polyproline II structure in a sequence of seven alanine residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 9190-9195.
- Shiraishi-Yamaguchi,Y. and Furuichi,T. (2007). The Homer family proteins. *Genome Biol.* *8*, 206.
- Sippl,M.J. (1990). Calculation of conformational ensembles from potentials of mean force. An approach to the knowledge-based prediction of local structures in globular proteins. *J. Mol. Biol.* *213*, 859-883.
- Sklenar, V., Piotto, M., Leppik, R. und Saudek, V. Gradient-Tailored Water Suppression for 1H-15N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity. *J.Magn Reson.* *102*[2], 241-245. 8-1-1993.
- Skoble,J., Portnoy,D.A., and Welch,M.D. (2000). Three regions within ActA promote Arp2/3 complex-mediated actin nucleation and *Listeria monocytogenes* motility. *J. Cell Biol.* *150*, 527-538.
- Smith,G.A., Theriot,J.A., and Portnoy,D.A. (1996). The tandem repeat domain in the *Listeria monocytogenes* ActA protein controls the rate of actin-based motility, the percentage of moving bacteria, and the localization of vasodilator-stimulated phosphoprotein and profilin. *J. Cell Biol.* *135*, 647-660.
- Southwick,F.S. and Purich,D.L. (1994). Arrest of *Listeria* movement in host cells by a bacterial ActA analogue: implications for actin-based motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 5168-5172.
- Sparks,A.B., Rider,J.E., Hoffman,N.G., Fowlkes,D.M., Quillam,L.A., and Kay,B.K. (1996). Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 1540-1544.
- Stapley,B.J. and Creamer,T.P. (1999). A survey of left-handed polyproline II helices. *Protein Sci* *8*, 587-595.

- Sudarman,E., Bollati-Fogolin,M., Hafner,M., Muller,W., Scheller,J., Rose-John,S., and Eichler,J. (2008). Synthetic mimetics of the gp130 binding site for viral interleukin-6 as inhibitors of the vIL-6-gp130 interaction. *Chem. Biol. Drug Des* *71*, 494-500.
- Theobald,D.L. and Wuttke,D.S. (2006). THESEUS: maximum likelihood superpositioning and analysis of macromolecular structures. *Bioinformatics* *22*, 2171-2172.
- Theriot,J.A., Mitchison,T.J., Tilney,L.G., and Portnoy,D.A. (1992). The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature* *357*, 257-260.
- Theriot,J.A., Rosenblatt,J., Portnoy,D.A., Goldschmidt-Clermont,P.J., and Mitchison,T.J. (1994). Involvement of profilin in the actin-based motility of *L. monocytogenes* in cells and in cell-free extracts. *Cell* *76*, 505-517.
- Tilney,L.G. and Portnoy,D.A. (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* *109*, 1597-1608.
- Tu,J.C., Xiao,B., Yuan,J.P., Lanahan,A.A., Leoffert,K., Li,M., Linden,D.J., and Worley,P.F. (1998). Homer Binds a Novel Proline-Rich Motif and Links Group 1 Metabotropic Glutamate Receptors with IP3 Receptors. *Neuron* *21*, 717-726.
- Vaynberg,J. and Qin,J. (2006). Weak protein-protein interactions as probed by NMR spectroscopy. *Trends in Biotechnology* *24*, 22-27.
- Vazquez-Boland,J.A., Kuhn,M., Berche,P., Chakraborty,T., Dominguez-Bernal,G., Goebel,W., Gonzalez-Zorn,B., Wehland,J., and Kreft,J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* *14*, 584-640.
- Volkman,B.F., Prehoda,K.E., Scott,J.A., Peterson,F.C., and Lim,W.A. (2002). Structure of the N-WASP EVH1 domain-WIP complex: insight into the molecular basis of Wiskott-Aldrich Syndrome. *Cell* *111*, 565-576.
- Vriend,G. (1990). WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* *8*, 52-6, 29.
- Walders-Harbeck,B., Khaitlina,S.Y., Hinssen,H., Jockusch,B.M., and Illenberger,S. (2002). The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin. *FEBS Lett.* *529*, 275-280.
- Wang,J., Cieplak,P., and Kollmann,P.A. (2000). How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *Journal of Computational Chemistry* *21*, 1049-1078.
- Welch,M.D., Rosenblatt,J., Skoble,J., Portnoy,D.A., and Mitchison,T.J. (1998). Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* *281*, 105-108.
- Williamson,M.P. (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J* *297* ( Pt 2), 249-260.
- Wills, Zachary, Bateman, Jack, Korey, Christopher A., Comer, Allen und Van Vactor, David. The Tyrosine Kinase Abl and Its Substrate Enabled Collaborate with the Receptor Phosphatase Dlar to Control Motor Axon Guidance. *22[2]*, 301-312. 1-2-1999.

- Wilson,K.A., Kalkum,M., Ottesen,J., Yuzenkova,J., Chait,B.T., Landick,R., Muir,T., Severinov,K., and Darst,S.A. (2003). Structure of Microcin J25, a Peptide Inhibitor of Bacterial RNA Polymerase, is a Lassoed Tail. *Journal of the American Chemical Society* *125*, 12475-12483.
- Wishart,D.S. and Sykes,B.D. (1994). Chemical shifts as a tool for structure determination. *Methods Enzymol.* *239*, 363-392.
- Wishart,D.S., Sykes,B.D., and Richards,F.M. (1991). Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J. Mol. Biol.* *222*, 311-333.
- Wishart,D.S., Sykes,B.D., and Richards,F.M. (1992). The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry* *31*, 1647-1651.
- Wüthrich,K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. (New York: John Wiley & Sons).
- Yaffe,M.B. (2002). Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 177-186.
- Zarrinpar,A., Bhattacharyya,R.P., and Lim,W.A. (2003). The structure and function of proline recognition domains. *Sci STKE.* *2003*, RE8.
- Zhang,Y., Tu,Y., Gkretsi,V., and Wu,C. (2006). Migfilin interacts with vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) and regulates VASP localization to cell-matrix adhesions and migration. *J Biol Chem.* *281*, 12397-12407.
- Zigmond,S.H. (2000). How WASP regulates actin polymerization. *J. Cell Biol.* *150*, F117-F120.
- Zimmermann,J., Labudde,D., Jarchau,T., Walter,U., Oschkinat,H., and Ball,L.J. (2002). Relaxation, equilibrium oligomerization, and molecular symmetry of the VASP (336-380) EVH2 tetramer. *Biochemistry* *41*, 11143-11151.
-

## VI. ANHANG

### 1. Chemische Verschiebungen und Abstandsbeschränkungen für die Strukturberechnung von pGolemi

#### Shifts.tab (NMRStar 3.1 Format)

```

loop_
  _Atom_chem_shift.ID
  _Atom_chem_shift.Assembly_atom_ID
  _Atom_chem_shift.Entity_assembly_ID
  _Atom_chem_shift.Entity_ID
  _Atom_chem_shift.Comp_index_ID
  _Atom_chem_shift.Seq_ID
  _Atom_chem_shift.Comp_ID
  _Atom_chem_shift.Atom_ID
  _Atom_chem_shift.Atom_type
  _Atom_chem_shift.Atom_isotope_number
  _Atom_chem_shift.Val
  _Atom_chem_shift.Val_err
  _Atom_chem_shift.Assign_fig_of_merit
  _Atom_chem_shift.Ambiguity_code
  _Atom_chem_shift.Occupancy
  _Atom_chem_shift.Resonance_ID
  _Atom_chem_shift.Auth_entity_assembly_ID
  _Atom_chem_shift.Auth_seq_ID
  _Atom_chem_shift.Auth_comp_ID
  _Atom_chem_shift.Auth_atom_ID
  _Atom_chem_shift.Details
  _Atom_chem_shift.Entry_ID
  _Atom_chem_shift.Assigned_chem_shift_list_ID

1 . 1 1 1 1 PRO HA H 1 4.236 . . 5 . . . 1 PRO HA .15946 1
2 . 1 1 1 1 PRO HB2 H 1 1.701 . . 5 . . . 1 PRO HB2 .15946 1
3 . 1 1 1 1 PRO HB3 H 1 1.701 . . 2 . . . 1 PRO HB3 .15946 1
4 . 1 1 1 1 PRO HD2 H 1 3.398 . . 5 . . . 1 PRO HD2 .15946 1
5 . 1 1 1 1 PRO HD3 H 1 3.398 . . 2 . . . 1 PRO HD3 .15946 1
6 . 1 1 1 1 PRO HG2 H 1 1.736 . . 5 . . . 1 PRO HG2 .15946 1
7 . 1 1 1 1 PRO HG3 H 1 1.736 . . 2 . . . 1 PRO HG3 .15946 1
8 . 1 1 2 2 PHE H H 1 8.049 . . 1 . . . 2 PHE H .15946 1
9 . 1 1 2 2 PHE HA H 1 4.745 . . 1 . . . 2 PHE HA .15946 1
10 . 1 1 2 2 PHE HB2 H 1 2.962 . . 1 . . . 2 PHE HB2 .15946 1
11 . 1 1 2 2 PHE HB3 H 1 2.689 . . 1 . . . 2 PHE HB3 .15946 1
12 . 1 1 2 2 PHE HD1 H 1 7.111 . . 3 . . . 2 PHE HD1 .15946 1
13 . 1 1 2 2 PHE HD2 H 1 7.111 . . 3 . . . 2 PHE HD2 .15946 1
14 . 1 1 2 2 PHE HE1 H 1 7.104 . . 3 . . . 2 PHE HE1 .15946 1
15 . 1 1 2 2 PHE HE2 H 1 7.104 . . 3 . . . 2 PHE HE2 .15946 1
16 . 1 1 3 3 PRO HD2 H 1 3.507 . . 2 . . . 3 PRO HD2 .15946 1
17 . 1 1 3 3 PRO HD3 H 1 3.377 . . 2 . . . 3 PRO HD3 .15946 1
18 . 1 1 4 4 PRO HA H 1 4.386 . . 1 . . . 4 PRO HA .15946 1
19 . 1 1 4 4 PRO HB2 H 1 2.182 . . 2 . . . 4 PRO HB2 .15946 1
20 . 1 1 4 4 PRO HB3 H 1 2.182 . . 2 . . . 4 PRO HB3 .15946 1
21 . 1 1 4 4 PRO HG2 H 1 1.908 . . 2 . . . 4 PRO HG2 .15946 1
22 . 1 1 4 4 PRO HG3 H 1 1.908 . . 2 . . . 4 PRO HG3 .15946 1
23 . 1 1 5 5 THR H H 1 8.402 . . 1 . . . 5 THR H .15946 1
24 . 1 1 5 5 THR HA H 1 4.339 . . 1 . . . 5 THR HA .15946 1
25 . 1 1 5 5 THR HB H 1 3.807 . . 1 . . . 5 THR HB .15946 1
26 . 1 1 5 5 THR HG1 H 1 1.072 . . 1 . . . 5 THR HG1 .15946 1
27 . 1 1 6 6 PRO HA H 1 3.810 . . 1 . . . 6 PRO HA .15946 1
28 . 1 1 6 6 PRO HB2 H 1 1.564 . . 2 . . . 6 PRO HB2 .15946 1
29 . 1 1 6 6 PRO HB3 H 1 1.564 . . 2 . . . 6 PRO HB3 .15946 1
30 . 1 1 6 6 PRO HD2 H 1 3.807 . . 2 . . . 6 PRO HD2 .15946 1
31 . 1 1 6 6 PRO HD3 H 1 3.807 . . 2 . . . 6 PRO HD3 .15946 1
32 . 1 1 6 6 PRO HG2 H 1 1.783 . . 2 . . . 6 PRO HG2 .15946 1

```



33	.	1	1	6	6	PRO	HG3	H	1	1.674	.	2	.	.	.	6	PRO	HG3	.15946	1
34	.	1	1	7	7	PRO	HA	H	1	4.236	.	5	.	.	.	7	PRO	HA	.15946	1
35	.	1	1	7	7	PRO	HB2	H	1	1.701	.	5	.	.	.	7	PRO	HB2	.15946	1
36	.	1	1	7	7	PRO	HB3	H	1	1.701	.	2	.	.	.	7	PRO	HB3	.15946	1
37	.	1	1	7	7	PRO	HD2	H	1	3.398	.	5	.	.	.	7	PRO	HD2	.15946	1
38	.	1	1	7	7	PRO	HD3	H	1	3.398	.	2	.	.	.	7	PRO	HD3	.15946	1
39	.	1	1	7	7	PRO	HG2	H	1	1.736	.	5	.	.	.	7	PRO	HG2	.15946	1
40	.	1	1	7	7	PRO	HG3	H	1	1.736	.	2	.	.	.	7	PRO	HG3	.15946	1
41	.	1	1	8	8	GLY	H	H	1	8.174	.	1	.	.	.	8	GLY	H	.15946	1
42	.	1	1	8	8	GLY	HA2	H	1	3.849	.	2	.	.	.	8	GLY	HA2	.15946	1
43	.	1	1	8	8	GLY	HA3	H	1	3.771	.	2	.	.	.	8	GLY	HA3	.15946	1
44	.	1	1	9	9	GLU	H	H	1	8.338	.	1	.	.	.	9	GLU	H	.15946	1
45	.	1	1	9	9	GLU	HA	H	1	3.877	.	1	.	.	.	9	GLU	HA	.15946	1
46	.	1	1	9	9	GLU	HB2	H	1	2.111	.	2	.	.	.	9	GLU	HB2	.15946	1
47	.	1	1	9	9	GLU	HB3	H	1	2.111	.	2	.	.	.	9	GLU	HB3	.15946	1
48	.	1	1	9	9	GLU	HG2	H	1	1.814	.	2	.	.	.	9	GLU	HG2	.15946	1
49	.	1	1	9	9	GLU	HG3	H	1	1.814	.	2	.	.	.	9	GLU	HG3	.15946	1
50	.	1	1	10	10	GLU	H	H	1	8.643	.	1	.	.	.	10	GLU	H	.15946	1
51	.	1	1	10	10	GLU	HA	H	1	4.129	.	1	.	.	.	10	GLU	HA	.15946	1
52	.	1	1	10	10	GLU	HB2	H	1	2.012	.	2	.	.	.	10	GLU	HB2	.15946	1
53	.	1	1	10	10	GLU	HB3	H	1	1.763	.	2	.	.	.	10	GLU	HB3	.15946	1
54	.	1	1	11	11	ALA	H	H	1	7.382	.	1	.	.	.	11	ALA	H	.15946	1
55	.	1	1	11	11	ALA	HA	H	1	4.293	.	1	.	.	.	11	ALA	HA	.15946	1
56	.	1	1	11	11	ALA	HB1	H	1	1.243	.	1	.	.	.	11	ALA	MB	.15946	1
57	.	1	1	11	11	ALA	HB2	H	1	1.243	.	1	.	.	.	11	ALA	MB	.15946	1
58	.	1	1	11	11	ALA	HB3	H	1	1.243	.	1	.	.	.	11	ALA	MB	.15946	1
59	.	1	1	12	12	PRO	HA	H	1	4.447	.	1	.	.	.	12	PRO	HA	.15946	1
60	.	1	1	12	12	PRO	HB2	H	1	2.254	.	2	.	.	.	12	PRO	HB2	.15946	1
61	.	1	1	12	12	PRO	HB3	H	1	1.986	.	2	.	.	.	12	PRO	HB3	.15946	1
62	.	1	1	12	12	PRO	HD2	H	1	3.670	.	2	.	.	.	12	PRO	HD2	.15946	1
63	.	1	1	12	12	PRO	HD3	H	1	3.670	.	2	.	.	.	12	PRO	HD3	.15946	1
64	.	1	1	12	12	PRO	HG2	H	1	1.806	.	2	.	.	.	12	PRO	HG2	.15946	1
65	.	1	1	12	12	PRO	HG3	H	1	1.806	.	2	.	.	.	12	PRO	HG3	.15946	1
66	.	1	1	13	13	VAL	H	H	1	8.549	.	1	.	.	.	13	VAL	H	.15946	1
67	.	1	1	13	13	VAL	HA	H	1	3.674	.	1	.	.	.	13	VAL	HA	.15946	1
68	.	1	1	13	13	VAL	HB	H	1	1.986	.	1	.	.	.	13	VAL	HB	.15946	1
69	.	1	1	13	13	VAL	HG11H	1	0.923	.	2	.	.	.	.	13	VAL	MG1	.15946	1
70	.	1	1	13	13	VAL	HG12H	1	0.923	.	2	.	.	.	.	13	VAL	MG1	.15946	1
71	.	1	1	13	13	VAL	HG13H	1	0.923	.	2	.	.	.	.	13	VAL	MG1	.15946	1
72	.	1	1	13	13	VAL	HG21H	1	0.829	.	2	.	.	.	.	13	VAL	MG2	.15946	1
73	.	1	1	13	13	VAL	HG22H	1	0.829	.	2	.	.	.	.	13	VAL	MG2	.15946	1
74	.	1	1	13	13	VAL	HG23H	1	0.829	.	2	.	.	.	.	13	VAL	MG2	.15946	1
75	.	1	1	14	14	GLU	H	H	1	9.063	.	1	.	.	.	14	GLU	H	.15946	1
76	.	1	1	14	14	GLU	HA	H	1	3.896	.	1	.	.	.	14	GLU	HA	.15946	1
77	.	1	1	14	14	GLU	HB2	H	1	1.986	.	2	.	.	.	14	GLU	HB2	.15946	1
78	.	1	1	14	14	GLU	HB3	H	1	1.880	.	2	.	.	.	14	GLU	HB3	.15946	1
79	.	1	1	14	14	GLU	HG2	H	1	2.293	.	2	.	.	.	14	GLU	HG2	.15946	1
80	.	1	1	14	14	GLU	HG3	H	1	2.158	.	2	.	.	.	14	GLU	HG3	.15946	1
81	.	1	1	15	15	ASP	H	H	1	7.588	.	1	.	.	.	15	ASP	H	.15946	1
82	.	1	1	15	15	ASP	HA	H	1	4.439	.	1	.	.	.	15	ASP	HA	.15946	1
83	.	1	1	15	15	ASP	HB2	H	1	2.689	.	2	.	.	.	15	ASP	HB2	.15946	1
84	.	1	1	15	15	ASP	HB3	H	1	2.409	.	2	.	.	.	15	ASP	HB3	.15946	1
85	.	1	1	16	16	LEU	H	H	1	7.593	.	1	.	.	.	16	LEU	H	.15946	1
86	.	1	1	16	16	LEU	HA	H	1	4.033	.	1	.	.	.	16	LEU	HA	.15946	1
87	.	1	1	16	16	LEU	HB2	H	1	1.553	.	2	.	.	.	16	LEU	HB2	.15946	1
88	.	1	1	16	16	LEU	HB3	H	1	1.547	.	2	.	.	.	16	LEU	HB3	.15946	1
89	.	1	1	16	16	LEU	HD11H	1	0.752	.	4	.	.	.	.	16	LEU	MD1	.15946	1
90	.	1	1	16	16	LEU	HD12H	1	0.752	.	4	.	.	.	.	16	LEU	MD1	.15946	1
91	.	1	1	16	16	LEU	HD13H	1	0.752	.	4	.	.	.	.	16	LEU	MD1	.15946	1
92	.	1	1	16	16	LEU	HD21H	1	0.752	.	4	.	.	.	.	16	LEU	MD2	.15946	1
93	.	1	1	16	16	LEU	HD22H	1	0.752	.	4	.	.	.	.	16	LEU	MD2	.15946	1
94	.	1	1	16	16	LEU	HD23H	1	0.752	.	4	.	.	.	.	16	LEU	MD2	.15946	1
95	.	1	1	16	16	LEU	HG	H	1	0.752	.	4	.	.	.	16	LEU	HG	.15946	1
96	.	1	1	17	17	ILE	H	H	1	8.252	.	1	.	.	.	17	ILE	H	.15946	1
97	.	1	1	17	17	ILE	HA	H	1	3.592	.	1	.	.	.	17	ILE	HA	.15946	1
98	.	1	1	17	17	ILE	HB	H	1	1.724	.	1	.	.	.	17	ILE	HB	.15946	1
99	.	1	1	17	17	ILE	HD11H	1	0.705	.	1	.	.	.	.	17	ILE	MD	.15946	1
100	.	1	1	17	17	ILE	HD12H	1	0.705	.	1	.	.	.	.	17	ILE	MD	.15946	1
101	.	1	1	17	17	ILE	HD13H	1	0.705	.	1	.	.	.	.	17	ILE	MD	.15946	1
102	.	1	1	17	17	ILE	HG12H	1	1.579	.	2	.	.	.	.	17	ILE	HG12	.15946	1
103	.	1	1	17	17	ILE	HG13H	1	0.963	.	2	.	.	.	.	17	ILE	HG13	.15946	1
104	.	1	1	17	17	ILE	HG21H	1	0.814	.	1	.	.	.	.	17	ILE	MG	.15946	1
105	.	1	1	17	17	ILE	HG22H	1	0.814	.	1	.	.	.	.	17	ILE	MG	.15946	1
106	.	1	1	17	17	ILE	HG23H	1	0.814	.	1	.	.	.	.	17	ILE	MG	.15946	1
107	.	1	1	18	18	ARG	H	H	1	7.499	.	1	.	.	.	18	ARG	H	.15946	1
108	.	1	1	18	18	ARG	HA	H	1	4.002	.	1	.	.	.	18	ARG	HA	.15946	1
109	.	1	1	18	18	ARG	HB2	H	1	1.838	.	2	.	.	.	18	ARG	HB2	.15946	1

110.	1	1	18	18	ARG	HB3	H	1	1.838	.	2	.	.	.	18	ARG	HB3	.15946	1
111.	1	1	18	18	ARG	HD2	H	1	3.149	.	2	.	.	.	18	ARG	HD2	.15946	1
112.	1	1	18	18	ARG	HD3	H	1	3.149	.	2	.	.	.	18	ARG	HD3	.15946	1
113.	1	1	18	18	ARG	HE	H	1	6.853	.	1	.	.	.	18	ARG	HE	.15946	1
114.	1	1	18	18	ARG	HG2	H	1	1.572	.	2	.	.	.	18	ARG	HG2	.15946	1
115.	1	1	18	18	ARG	HG3	H	1	1.721	.	2	.	.	.	18	ARG	HG3	.15946	1
116.	1	1	19	19	PHE	H	H	1	7.849	.	1	.	.	.	19	PHE	H	.15946	1
117.	1	1	19	19	PHE	HA	H	1	4.330	.	1	.	.	.	19	PHE	HA	.15946	1
118.	1	1	19	19	PHE	HB2	H	1	3.041	.	2	.	.	.	19	PHE	HB2	.15946	1
119.	1	1	19	19	PHE	HB3	H	1	3.166	.	2	.	.	.	19	PHE	HB3	.15946	1
120.	1	1	19	19	PHE	HD1	H	1	6.979	.	4	.	.	.	19	PHE	HD1	.15946	1
121.	1	1	19	19	PHE	HD2	H	1	6.979	.	3	.	.	.	19	PHE	HD2	.15946	1
122.	1	1	19	19	PHE	HE1	H	1	6.979	.	4	.	.	.	19	PHE	HE1	.15946	1
123.	1	1	19	19	PHE	HE2	H	1	6.979	.	3	.	.	.	19	PHE	HE2	.15946	1
124.	1	1	20	20	TYR	H	H	1	8.496	.	1	.	.	.	20	TYR	H	.15946	1
125.	1	1	20	20	TYR	HA	H	1	3.744	.	1	.	.	.	20	TYR	HA	.15946	1
126.	1	1	20	20	TYR	HB2	H	1	2.876	.	2	.	.	.	20	TYR	HB2	.15946	1
127.	1	1	20	20	TYR	HB3	H	1	3.117	.	2	.	.	.	20	TYR	HB3	.15946	1
128.	1	1	20	20	TYR	HD1	H	1	6.807	.	3	.	.	.	20	TYR	HD1	.15946	1
129.	1	1	20	20	TYR	HD2	H	1	6.807	.	3	.	.	.	20	TYR	HD2	.15946	1
130.	1	1	20	20	TYR	HE1	H	1	6.471	.	3	.	.	.	20	TYR	HE1	.15946	1
131.	1	1	20	20	TYR	HE2	H	1	6.471	.	3	.	.	.	20	TYR	HE2	.15946	1
132.	1	1	21	21	ASN	H	H	1	8.174	.	1	.	.	.	21	ASN	H	.15946	1
133.	1	1	21	21	ASN	HA	H	1	4.231	.	1	.	.	.	21	ASN	HA	.15946	1
134.	1	1	21	21	ASN	HB2	H	1	2.822	.	2	.	.	.	21	ASN	HB2	.15946	1
135.	1	1	21	21	ASN	HB3	H	1	2.697	.	2	.	.	.	21	ASN	HB3	.15946	1
136.	1	1	21	21	ASN	HD21H	H	1	6.455	.	2	.	.	.	21	ASN	HD21	.15946	1
137.	1	1	22	22	ASP	H	H	1	8.464	.	1	.	.	.	22	ASP	H	.15946	1
138.	1	1	22	22	ASP	HA	H	1	4.268	.	1	.	.	.	22	ASP	HA	.15946	1
139.	1	1	22	22	ASP	HB2	H	1	2.353	.	2	.	.	.	22	ASP	HB2	.15946	1
140.	1	1	22	22	ASP	HB3	H	1	2.353	.	2	.	.	.	22	ASP	HB3	.15946	1
141.	1	1	23	23	LEU	H	H	1	8.838	.	1	.	.	.	23	LEU	H	.15946	1
142.	1	1	23	23	LEU	HA	H	1	3.744	.	1	.	.	.	23	LEU	HA	.15946	1
143.	1	1	23	23	LEU	HB2	H	1	1.478	.	2	.	.	.	23	LEU	HB2	.15946	1
144.	1	1	23	23	LEU	HB3	H	1	1.329	.	4	.	.	.	23	LEU	HB3	.15946	1
145.	1	1	23	23	LEU	HD11H	H	1	0.814	.	2	.	.	.	23	LEU	MD1	.15946	1
146.	1	1	23	23	LEU	HD12H	H	1	0.814	.	2	.	.	.	23	LEU	MD1	.15946	1
147.	1	1	23	23	LEU	HD13H	H	1	0.814	.	2	.	.	.	23	LEU	MD1	.15946	1
148.	1	1	23	23	LEU	HD21H	H	1	0.713	.	2	.	.	.	23	LEU	MD2	.15946	1
149.	1	1	23	23	LEU	HD22H	H	1	0.713	.	2	.	.	.	23	LEU	MD2	.15946	1
150.	1	1	23	23	LEU	HD23H	H	1	0.713	.	2	.	.	.	23	LEU	MD2	.15946	1
151.	1	1	23	23	LEU	HG	H	1	1.329	.	4	.	.	.	23	LEU	HG	.15946	1
152.	1	1	24	24	GLN	H	H	1	8.114	.	1	.	.	.	24	GLN	H	.15946	1
153.	1	1	24	24	GLN	HA	H	1	3.478	.	1	.	.	.	24	GLN	HA	.15946	1
154.	1	1	24	24	GLN	HB2	H	1	2.009	.	2	.	.	.	24	GLN	HB2	.15946	1
155.	1	1	24	24	GLN	HB3	H	1	1.924	.	2	.	.	.	24	GLN	HB3	.15946	1
156.	1	1	24	24	GLN	HG2	H	1	2.135	.	2	.	.	.	24	GLN	HG2	.15946	1
157.	1	1	24	24	GLN	HG3	H	1	2.127	.	2	.	.	.	24	GLN	HG3	.15946	1
158.	1	1	25	25	GLN	H	H	1	7.534	.	1	.	.	.	25	GLN	H	.15946	1
159.	1	1	25	25	GLN	HA	H	1	3.904	.	1	.	.	.	25	GLN	HA	.15946	1
160.	1	1	25	25	GLN	HB2	H	1	1.981	.	2	.	.	.	25	GLN	HB2	.15946	1
161.	1	1	25	25	GLN	HB3	H	1	1.994	.	2	.	.	.	25	GLN	HB3	.15946	1
162.	1	1	25	25	GLN	HG2	H	1	2.293	.	2	.	.	.	25	GLN	HG2	.15946	1
163.	1	1	25	25	GLN	HG3	H	1	2.283	.	2	.	.	.	25	GLN	HG3	.15946	1
164.	1	1	26	26	TYR	H	H	1	7.784	.	1	.	.	.	26	TYR	H	.15946	1
165.	1	1	26	26	TYR	HA	H	1	4.049	.	1	.	.	.	26	TYR	HA	.15946	1
166.	1	1	26	26	TYR	HB2	H	1	2.955	.	2	.	.	.	26	TYR	HB2	.15946	1
167.	1	1	26	26	TYR	HB3	H	1	2.923	.	2	.	.	.	26	TYR	HB3	.15946	1
168.	1	1	26	26	TYR	HD1	H	1	6.768	.	3	.	.	.	26	TYR	HD1	.15946	1
169.	1	1	26	26	TYR	HD2	H	1	6.760	.	3	.	.	.	26	TYR	HD2	.15946	1
170.	1	1	26	26	TYR	HE1	H	1	6.424	.	3	.	.	.	26	TYR	HE1	.15946	1
171.	1	1	26	26	TYR	HE2	H	1	6.424	.	3	.	.	.	26	TYR	HE2	.15946	1
172.	1	1	27	27	LEU	H	H	1	8.363	.	1	.	.	.	27	LEU	H	.15946	1
173.	1	1	27	27	LEU	HA	H	1	3.643	.	1	.	.	.	27	LEU	HA	.15946	1
174.	1	1	27	27	LEU	HB2	H	1	1.643	.	2	.	.	.	27	LEU	HB2	.15946	1
175.	1	1	27	27	LEU	HB3	H	1	1.494	.	2	.	.	.	27	LEU	HB3	.15946	1
176.	1	1	27	27	LEU	HD11H	H	1	0.666	.	2	.	.	.	27	LEU	MD1	.15946	1
177.	1	1	27	27	LEU	HD12H	H	1	0.666	.	2	.	.	.	27	LEU	MD1	.15946	1
178.	1	1	27	27	LEU	HD13H	H	1	0.666	.	2	.	.	.	27	LEU	MD1	.15946	1
179.	1	1	27	27	LEU	HD21H	H	1	0.478	.	2	.	.	.	27	LEU	MD2	.15946	1
180.	1	1	27	27	LEU	HD22H	H	1	0.478	.	2	.	.	.	27	LEU	MD2	.15946	1
181.	1	1	27	27	LEU	HD23H	H	1	0.478	.	2	.	.	.	27	LEU	MD2	.15946	1
182.	1	1	27	27	LEU	HG	H	1	1.119	.	1	.	.	.	27	LEU	HG	.15946	1
183.	1	1	28	28	ASN	H	H	1	7.698	.	1	.	.	.	28	ASN	H	.15946	1
184.	1	1	28	28	ASN	HA	H	1	4.285	.	1	.	.	.	28	ASN	HA	.15946	1
185.	1	1	28	28	ASN	HB2	H	1	2.666	.	2	.	.	.	28	ASN	HB2	.15946	1
186.	1	1	28	28	ASN	HB3	H	1	2.662	.	2	.	.	.	28	ASN	HB3	.15946	1

```

187. 1 1 29 29 VAL H H 1 7.471 . . 1 . . . 29 VAL H .15946 1
188. 1 1 29 29 VAL HA H 1 3.771 . . 1 . . . 29 VAL HA .15946 1
189. 1 1 29 29 VAL HB H 1 1.935 . . 1 . . . 29 VAL HB .15946 1
190. 1 1 29 29 VAL HG11H 1 0.806 . . 2 . . . 29 VAL MG1 .15946 1
191. 1 1 29 29 VAL HG12H 1 0.806 . . 2 . . . 29 VAL MG1 .15946 1
192. 1 1 29 29 VAL HG13H 1 0.806 . . 2 . . . 29 VAL MG1 .15946 1
193. 1 1 29 29 VAL HG21H 1 0.679 . . 2 . . . 29 VAL MG2 .15946 1
194. 1 1 29 29 VAL HG22H 1 0.679 . . 2 . . . 29 VAL MG2 .15946 1
195. 1 1 29 29 VAL HG23H 1 0.679 . . 2 . . . 29 VAL MG2 .15946 1
196. 1 1 30 30 VAL H H 1 7.588 . . 1 . . . 30 VAL H .15946 1
197. 1 1 30 30 VAL HA H 1 3.756 . . 1 . . . 30 VAL HA .15946 1
198. 1 1 30 30 VAL HB H 1 1.722 . . 1 . . . 30 VAL HB .15946 1
199. 1 1 30 30 VAL HG11H 1 0.533 . . 2 . . . 30 VAL MG1 .15946 1
200. 1 1 30 30 VAL HG12H 1 0.533 . . 2 . . . 30 VAL MG1 .15946 1
201. 1 1 30 30 VAL HG13H 1 0.533 . . 2 . . . 30 VAL MG1 .15946 1
202. 1 1 30 30 VAL HG21H 1 0.494 . . 2 . . . 30 VAL MG2 .15946 1
203. 1 1 30 30 VAL HG22H 1 0.494 . . 2 . . . 30 VAL MG2 .15946 1
204. 1 1 30 30 VAL HG23H 1 0.494 . . 2 . . . 30 VAL MG2 .15946 1
stop_

```

## NOE\_constraints.tab

```

assign (resid 26 and name HD1) (resid 27 and name HN) 3.3 1.0 1.0
assign (resid 26 and name HD*) (resid 26 and name HE*) 2.2 0.7 0.7
assign (resid 26 and name HD*) (resid 27 and name HA) 3.5 1.1 1.1
assign (resid 26 and name HD*) (resid 27 and name HB2) 4.5 0.8 1.2
assign (resid 26 and name HE1) (resid 27 and name HA) 4.2 1.2 1.2
assign (resid 26 and name HE1) (resid 27 and name HB1) 5.5 1.1 1.5
assign (resid 26 and name HE1) (resid 27 and name HB2) 5.5 1.1 1.5
assign (resid 26 and name HE*) (resid 26 and name HN) 5.1 1.5 1.8
assign (resid 26 and name HN) (resid 26 and name HB1) 2.7 0.8 0.8
assign (resid 26 and name HN) (resid 26 and name HD*) 3.3 1.0 1.0
assign (resid 26 and name HN) (resid 27 and name HA) 4.9 1.5 1.5
assign (resid 26 and name HN) (resid 27 and name HB*) 5.0 1.1 1.1
assign (resid 26 and name HN) (resid 27 and name HD2*) 6.0 1.3 1.3
assign (resid 26 and name HN) (resid 27 and name HG) 4.8 1.4 1.4
assign (resid 26 and name HN) (resid 27 and name HN) 3.1 0.9 0.9
assign (resid 26 and name HN) (resid 29 and name HG1*) 5.0 1.1 1.3
assign (resid 27 and name HA) (resid 28 and name HA) 4.3 0.7 0.7
assign (resid 27 and name HA) (resid 28 and name HN) 3.7 1.1 1.1
assign (resid 27 and name HA) (resid 30 and name HN) 4.9 1.5 1.5
assign (resid 27 and name HB1) (resid 27 and name HA) 3.0 0.9 0.9
assign (resid 27 and name HB1) (resid 27 and name HN) 2.9 0.9 0.9
assign (resid 27 and name HB1) (resid 28 and name HN) 3.1 0.9 0.9
assign (resid 27 and name HB2) (resid 27 and name HA) 3.3 1.0 1.0
assign (resid 27 and name HB2) (resid 28 and name HN) 3.2 1.0 1.0
assign (resid 27 and name HD1*) (resid 27 and name HA) 3.7 0.7 1.0
assign (resid 27 and name HD1*) (resid 27 and name HB1) 3.3 0.7 1.0
assign (resid 27 and name HD1*) (resid 27 and name HB2) 2.7 0.7 1.1
assign (resid 27 and name HD1*) (resid 27 and name HN) 3.8 1.0 1.0
assign (resid 27 and name HD1*) (resid 28 and name HN) 5.0 1.1 1.1
assign (resid 27 and name HD2*) (resid 27 and name HA) 2.7 0.8 0.8
assign (resid 27 and name HD2*) (resid 27 and name HB1) 2.7 0.9 1.0
assign (resid 27 and name HD2*) (resid 27 and name HB2) 3.3 1.1 1.3
assign (resid 27 and name HD2*) (resid 27 and name HN) 3.8 1.1 1.1
assign (resid 27 and name HD2*) (resid 28 and name HN) 5.0 1.1 1.1
assign (resid 27 and name HG) (resid 27 and name HA) 2.9 0.9 0.9
assign (resid 27 and name HG) (resid 27 and name HB1) 2.4 0.7 0.7
assign (resid 27 and name HG) (resid 27 and name HB2) 3.1 0.9 0.9
assign (resid 27 and name HG) (resid 27 and name HN) 3.2 0.9 0.9
assign (resid 27 and name HG) (resid 28 and name HN) 4.0 1.0 1.0
assign (resid 27 and name HN) (resid 27 and name HA) 3.2 1.0 1.0
assign (resid 27 and name HN) (resid 27 and name HB2) 2.8 0.8 0.8
assign (resid 27 and name HN) (resid 28 and name HN) 3.2 1.0 1.0
assign (resid 27 and name HN) (resid 29 and name HN) 4.7 1.4 1.4
assign (resid 27 and name HN) (resid 30 and name HA) 4.9 1.0 1.0
assign (resid 28 and name HA) (resid 28 and name HB*) 2.2 0.7 0.7
assign (resid 28 and name HA) (resid 28 and name HD21) 3.4 1.0 1.0
assign (resid 28 and name HA) (resid 28 and name HN) 2.8 0.8 0.8
assign (resid 28 and name HA) (resid 29 and name HN) 3.2 1.0 1.0
assign (resid 28 and name HB*) (resid 28 and name HD21) 2.8 0.8 0.8
assign (resid 28 and name HB*) (resid 28 and name HN) 2.5 0.8 0.8

```

```

assign (resid 28 and name HB*) (resid 29 and name HA) 4.0 1.1 1.1
assign (resid 28 and name HD21) (resid 29 and name HG2*) 6.5 1.3 1.5
assign (resid 28 and name HD21) (resid 30 and name HG2*) 5.5 1.6 1.6
assign (resid 28 and name HN) (resid 28 and name HB1) 2.6 0.8 1.0
assign (resid 28 and name HN) (resid 29 and name HA) 4.2 1.3 1.3
assign (resid 28 and name HN) (resid 29 and name HG2*) 4.0 1.1 1.1
assign (resid 28 and name HN) (resid 29 and name HN) 3.0 0.9 0.9
assign (resid 29 and name HA) (resid 29 and name HN) 2.9 0.9 0.9
assign (resid 29 and name HB) (resid 29 and name HA) 2.8 0.8 0.8
assign (resid 29 and name HB) (resid 29 and name HG1*) 2.4 0.7 0.7
assign (resid 29 and name HB) (resid 29 and name HG2*) 2.5 0.7 0.7
assign (resid 29 and name HB) (resid 29 and name HN) 2.7 0.8 0.8
assign (resid 29 and name HG2*) (resid 29 and name HN) 2.9 1.0 1.3
assign (resid 29 and name HG**) (resid 29 and name HA) 2.3 0.7 0.7
assign (resid 29 and name HG**) (resid 29 and name HB) 2.3 0.7 0.7
assign (resid 29 and name HN) (resid 30 and name HB) 3.9 1.3 1.3
assign (resid 29 and name HN) (resid 30 and name HN) 3.3 1.0 1.0
assign (resid 2 and name HA) (resid 26 and name HD2) 4.5 1.4 1.4
assign (resid 2 and name HA) (resid 26 and name HE2) 3.6 1.2 1.2
assign (resid 2 and name HA) (resid 2 and name HB1) 3.2 1.0 1.0
assign (resid 2 and name HA) (resid 2 and name HB2) 3.4 1.0 1.0
assign (resid 2 and name HA) (resid 2 and name HD*) 3.3 1.0 1.0
assign (resid 2 and name HA) (resid 2 and name HN) 3.3 1.0 1.0
assign (resid 2 and name HA) (resid 3 and name HD2) 2.7 0.8 0.8
assign (resid 2 and name HA) (resid 3 and name HD*) 2.8 0.8 0.8
assign (resid 2 and name HB1) (resid 2 and name HB2) 2.3 0.7 0.7
assign (resid 2 and name HB1) (resid 3 and name HD1) 3.7 1.0 1.0
assign (resid 2 and name HB1) (resid 3 and name HD2) 4.0 1.2 1.2
assign (resid 2 and name HB2) (resid 2 and name HD*) 3.0 0.9 0.9
assign (resid 2 and name HB2) (resid 3 and name HD1) 3.2 1.0 1.2
assign (resid 2 and name HB2) (resid 3 and name HD2) 3.6 1.1 1.1
assign (resid 2 and name HB*) (resid 2 and name HN) 3.0 0.9 0.9
assign (resid 2 and name HD*) (resid 2 and name HN) 4.4 1.3 1.3
assign (resid 2 and name HD*) (resid 3 and name HB*) 5.2 1.7 1.7
assign (resid 2 and name HD*) (resid 3 and name HD1) 3.7 1.5 1.5
assign (resid 2 and name HD*) (resid 3 and name HD2) 3.9 1.3 1.5
assign (resid 2 and name HE*) (resid 2 and name HN) 3.8 1.1 1.1
assign (resid 2 and name HN) (resid 26 and name HD2) 5.0 1.0 1.2
assign (resid 2 and name HN) (resid 2 and name HB1) 3.2 1.0 1.0
assign (resid 2 and name HN) (resid 2 and name HB2) 3.5 1.0 1.0
assign (resid 2 and name HN) (resid 3 and name HD1) 4.5 1.4 1.4
assign (resid 2 and name HN) (resid 3 and name HD2) 4.8 1.2 1.2
assign (resid 30 and name HB) (resid 30 and name HA) 2.5 0.8 0.8
assign (resid 30 and name HB) (resid 30 and name HN) 2.8 0.9 0.9
assign (resid 30 and name HG2*) (resid 30 and name HN) 2.7 0.8 0.8
assign (resid 30 and name HG**) (resid 30 and name HA) 2.5 0.8 0.8
assign (resid 30 and name HN) (resid 30 and name HA) 2.8 0.8 0.8
assign (resid 3 and name HB1) (resid 3 and name HD1) 3.3 1.0 1.0
assign (resid 3 and name HB1) (resid 3 and name HD2) 2.7 1.2 1.2
assign (resid 3 and name HB2) (resid 3 and name HD2) 3.1 0.9 0.9
assign (resid 3 and name HD1) (resid 26 and name HE2) 4.2 1.1 1.1
assign (resid 3 and name HD2) (resid 3 and name HD1) 2.4 0.7 0.7
assign (resid 3 and name HG*) (resid 3 and name HD1) 3.1 0.9 0.9
assign (resid 3 and name HG*) (resid 3 and name HD2) 3.2 1.0 1.0
assign (resid 4 and name HA) (resid 4 and name HB*) 2.5 0.7 0.7
assign (resid 4 and name HB1) (resid 22 and name HN) 4.0 1.1 1.1
assign (resid 4 and name HB*) (resid 19 and name HD2) 3.7 1.0 1.2
assign (resid 4 and name HB*) (resid 23 and name HD1*) 5.7 1.2 1.7
assign (resid 4 and name HB*) (resid 5 and name HN) 3.3 1.0 1.0
assign (resid 4 and name HG*) (resid 23 and name HN) 4.0 1.2 1.4
assign (resid 4 and name HG*) (resid 4 and name HA) 3.7 1.1 1.1
assign (resid 4 and name HG*) (resid 4 and name HB*) 1.9 0.6 0.6
assign (resid 5 and name HA) (resid 5 and name HB) 2.4 0.7 0.7
assign (resid 5 and name HA) (resid 5 and name HN) 2.4 0.7 0.7
assign (resid 5 and name HB) (resid 5 and name HN) 2.7 0.9 1.0
assign (resid 5 and name HG1) (resid 5 and name HA) 3.4 1.0 1.0
assign (resid 5 and name HG1) (resid 5 and name HB) 2.4 0.7 0.7
assign (resid 5 and name HG1) (resid 5 and name HN) 3.3 1.0 1.0
assign (resid 5 and name HG2*) (resid 6 and name HA) 4.7 1.5 1.5
assign (resid 5 and name HN) (resid 19 and name HD2) 3.9 1.2 1.2
assign (resid 5 and name HN) (resid 6 and name HD*) 3.9 1.2 1.2
assign (resid 6 and name HA) (resid 19 and name HD2) 3.4 1.0 1.5
assign (resid 6 and name HB*) (resid 6 and name HA) 3.6 1.1 1.1
assign (resid 6 and name HD1) (resid 6 and name HA) 2.4 0.8 1.0
assign (resid 6 and name HG*) (resid 6 and name HA) 2.9 0.9 0.9
assign (resid 7 and name HA) (resid 11 and name HB*) 4.3 1.3 1.3
assign (resid 7 and name HA) (resid 7 and name HD*) 3.9 1.2 1.2

```

```

assign (resid 7 and name HB*) (resid 11 and name HB*) 2.7 0.8 0.8
assign (resid 7 and name HB*) (resid 15 and name HB*) 4.0 1.2 1.5
assign (resid 7 and name HB*) (resid 7 and name HA) 2.8 0.8 0.8
assign (resid 7 and name HB*) (resid 7 and name HD*) 3.0 0.8 0.8
assign (resid 7 and name HB*) (resid 7 and name HG*) 2.0 0.6 0.6
assign (resid 7 and name HG2) (resid 7 and name HA) 3.1 0.9 0.9
assign (resid 7 and name HG*) (resid 11 and name HB*) 3.8 0.7 1.0
assign (resid 7 and name HG*) (resid 15 and name HB*) 4.1 1.3 1.5
assign (resid 7 and name HG*) (resid 7 and name HD*) 2.8 0.8 0.8
assign (resid 8 and name HA1) (resid 9 and name HN) 2.5 0.8 0.8
assign (resid 8 and name HA2) (resid 10 and name HN) 3.6 1.2 1.2
assign (resid 8 and name HA2) (resid 9 and name HN) 2.8 0.8 0.8
assign (resid 8 and name HA*) (resid 8 and name HN) 2.6 0.8 0.8
assign (resid 8 and name HA*) (resid 9 and name HN) 3.1 0.9 0.9
assign (resid 8 and name HN) (resid 11 and name HB*) 3.2 1.0 1.0
assign (resid 9 and name HA) (resid 10 and name HN) 2.7 0.8 0.8
assign (resid 9 and name HB*) (resid 9 and name HA) 3.0 0.9 0.9
assign (resid 9 and name HG*) (resid 9 and name HA) 2.6 0.8 0.8
assign (resid 9 and name HG*) (resid 9 and name HB*) 2.3 0.7 0.7
assign (resid 9 and name HN) (resid 10 and name HN) 3.2 1.0 1.0
assign (resid 9 and name HN) (resid 9 and name HA) 3.1 0.9 0.9

```

## Hydrogen\_constraints.tab

```

assign (resid 17 and name N) (resid 13 and name O) 2.85 0.45 0.45
assign (resid 17 and name HN) (resid 13 and name O) 1.8 0.4 0.5
assign (resid 18 and name N) (resid 14 and name O) 2.85 0.45 0.45
assign (resid 18 and name HN) (resid 14 and name O) 1.8 0.4 0.5
assign (resid 19 and name N) (resid 15 and name O) 2.85 0.45 0.45
assign (resid 19 and name HN) (resid 15 and name O) 1.8 0.4 0.5
assign (resid 20 and name N) (resid 16 and name O) 2.85 0.45 0.45
assign (resid 20 and name HN) (resid 16 and name O) 1.8 0.4 0.5
assign (resid 21 and name N) (resid 17 and name O) 2.85 0.45 0.45
assign (resid 21 and name HN) (resid 17 and name O) 1.8 0.4 0.5
assign (resid 22 and name N) (resid 18 and name O) 2.85 0.45 0.45
assign (resid 22 and name HN) (resid 18 and name O) 1.8 0.4 0.5
assign (resid 23 and name N) (resid 19 and name O) 2.85 0.45 0.45
assign (resid 23 and name HN) (resid 19 and name O) 1.8 0.4 0.5
assign (resid 24 and name N) (resid 20 and name O) 2.85 0.45 0.45
assign (resid 24 and name HN) (resid 20 and name O) 1.8 0.4 0.5
assign (resid 25 and name N) (resid 21 and name O) 2.85 0.45 0.45
assign (resid 25 and name HN) (resid 21 and name O) 1.8 0.4 0.5
assign (resid 26 and name N) (resid 22 and name O) 2.85 0.45 0.45
assign (resid 26 and name HN) (resid 22 and name O) 1.8 0.4 0.5
assign (resid 27 and name N) (resid 23 and name O) 2.85 0.45 0.45
assign (resid 27 and name HN) (resid 23 and name O) 1.8 0.4 0.5
assign (resid 28 and name N) (resid 24 and name O) 2.85 0.45 0.45
assign (resid 28 and name HN) (resid 24 and name O) 1.8 0.4 0.5
assign (resid 29 and name N) (resid 25 and name O) 2.85 0.45 0.45
assign (resid 29 and name HN) (resid 25 and name O) 1.8 0.4 0.5

```

## Talos\_constraints.tab

```

! 1. F 2 Phi -107.00 +/- 52.00 (-159.00 to -55.00)
assign (resid 1 and name C) (resid 2 and name N)
      (resid 2 and name CA) (resid 2 and name C) 1.0 -107.00 52.00 2

! 2. P 4 Phi -67.00 +/- 14.00 (-81.00 to -53.00)
assign (resid 3 and name C) (resid 4 and name N)
      (resid 4 and name CA) (resid 4 and name C) 1.0 -67.00 14.00 2

! 3. T 5 Phi -100.00 +/- 26.00 (-126.00 to -74.00)
assign (resid 4 and name C) (resid 5 and name N)
      (resid 5 and name CA) (resid 5 and name C) 1.0 -100.00 26.00 2

! 4. P 6 Phi -70.00 +/- 16.00 (-86.00 to -54.00)
assign (resid 5 and name C) (resid 6 and name N)
      (resid 6 and name CA) (resid 6 and name C) 1.0 -70.00 16.00 2

! 5. E 9 Phi -65.00 +/- 8.00 (-73.00 to -57.00)

```

```

assign (resid 8 and name C) (resid 9 and name N)
      (resid 9 and name CA) (resid 9 and name C) 1.0 -65.00 8.00 2

! 6. E 10 Phi -65.00 +/- 18.00 (-83.00 to -47.00)
assign (resid 9 and name C) (resid 10 and name N)
      (resid 10 and name CA) (resid 10 and name C) 1.0 -65.00 18.00 2

! 7. A 11 Phi -103.00 +/- 86.00 (-189.00 to -17.00)
assign (resid 10 and name C) (resid 11 and name N)
      (resid 11 and name CA) (resid 11 and name C) 1.0 -103.00 86.00 2

! 8. P 12 Phi -58.00 +/- 14.00 (-72.00 to -44.00)
assign (resid 11 and name C) (resid 12 and name N)
      (resid 12 and name CA) (resid 12 and name C) 1.0 -58.00 14.00 2

! 9. V 13 Phi -51.00 +/- 14.00 (-65.00 to -37.00)
assign (resid 12 and name C) (resid 13 and name N)
      (resid 13 and name CA) (resid 13 and name C) 1.0 -51.00 14.00 2

! 10. E 14 Phi -61.00 +/- 8.00 (-69.00 to -53.00)
assign (resid 13 and name C) (resid 14 and name N)
      (resid 14 and name CA) (resid 14 and name C) 1.0 -61.00 8.00 2

! 11. D 15 Phi -67.95 +/- 16.52 (-84.47 to -51.43)
assign (resid 14 and name C) (resid 15 and name N)
      (resid 15 and name CA) (resid 15 and name C) 1.0 -67.95 16.52 2

! 12. L 16 Phi -65.63 +/- 10.18 (-75.81 to -55.45)
assign (resid 15 and name C) (resid 16 and name N)
      (resid 16 and name CA) (resid 16 and name C) 1.0 -65.63 10.18 2

! 13. I 17 Phi -63.69 +/- 11.16 (-74.85 to -52.53)
assign (resid 16 and name C) (resid 17 and name N)
      (resid 17 and name CA) (resid 17 and name C) 1.0 -63.69 11.16 2

! 14. R 18 Phi -63.32 +/- 7.86 (-71.18 to -55.46)
assign (resid 17 and name C) (resid 18 and name N)
      (resid 18 and name CA) (resid 18 and name C) 1.0 -63.32 7.86 2

! 15. F 19 Phi -63.29 +/- 8.30 (-71.59 to -54.99)
assign (resid 18 and name C) (resid 19 and name N)
      (resid 19 and name CA) (resid 19 and name C) 1.0 -63.29 8.30 2

! 16. Y 20 Phi -63.74 +/- 5.92 (-69.66 to -57.82)
assign (resid 19 and name C) (resid 20 and name N)
      (resid 20 and name CA) (resid 20 and name C) 1.0 -63.74 5.92 2

! 17. N 21 Phi -58.08 +/- 10.76 (-68.84 to -47.32)
assign (resid 20 and name C) (resid 21 and name N)
      (resid 21 and name CA) (resid 21 and name C) 1.0 -58.08 10.76 2

! 18. D 22 Phi -67.45 +/- 28.00 (-95.45 to -39.45)
assign (resid 21 and name C) (resid 22 and name N)
      (resid 22 and name CA) (resid 22 and name C) 1.0 -67.45 28.00 2

! 19. L 23 Phi -60.39 +/- 9.78 (-70.17 to -50.61)
assign (resid 22 and name C) (resid 23 and name N)
      (resid 23 and name CA) (resid 23 and name C) 1.0 -60.39 9.78 2

! 20. Q 24 Phi -61.99 +/- 7.60 (-69.59 to -54.39)
assign (resid 23 and name C) (resid 24 and name N)
      (resid 24 and name CA) (resid 24 and name C) 1.0 -61.99 7.60 2

! 21. Q 25 Phi -62.51 +/- 8.12 (-70.63 to -54.39)
assign (resid 24 and name C) (resid 25 and name N)
      (resid 25 and name CA) (resid 25 and name C) 1.0 -62.51 8.12 2

! 22. Y 26 Phi -63.01 +/- 7.16 (-70.17 to -55.85)
assign (resid 25 and name C) (resid 26 and name N)
      (resid 26 and name CA) (resid 26 and name C) 1.0 -63.01 7.16 2

! 23. L 27 Phi -60.82 +/- 17.06 (-77.88 to -43.76)
assign (resid 26 and name C) (resid 27 and name N)
      (resid 27 and name CA) (resid 27 and name C) 1.0 -60.82 17.06 2

! 24. N 28 Phi -66.00 +/- 12.00 (-78.00 to -54.00)
assign (resid 27 and name C) (resid 28 and name N)

```

```

(resid 28 and name CA) (resid 28 and name C) 1.0 -66.00 12.00 2

! 25. V 29 Phi -68.00 +/- 18.00 (-86.00 to -50.00)
assign (resid 28 and name C) (resid 29 and name N)
(resid 29 and name CA) (resid 29 and name C) 1.0 -68.00 18.00 2

! 26. F 2 Psi 132.00 +/- 60.00 (72.00 to 192.00)
assign (resid 2 and name N) (resid 2 and name CA)
(resid 2 and name C) (resid 3 and name N) 1.0 132.00 60.00 2

! 27. P 4 Psi 145.00 +/- 24.00 (121.00 to 169.00)
assign (resid 4 and name N) (resid 4 and name CA)
(resid 4 and name C) (resid 5 and name N) 1.0 145.00 24.00 2

! 28. T 5 Psi 136.00 +/- 56.00 (80.00 to 192.00)
assign (resid 5 and name N) (resid 5 and name CA)
(resid 5 and name C) (resid 6 and name N) 1.0 136.00 56.00 2

! 29. P 6 Psi 161.00 +/- 8.00 (153.00 to 169.00)
assign (resid 6 and name N) (resid 6 and name CA)
(resid 6 and name C) (resid 7 and name N) 1.0 161.00 8.00 2

! 30. E 9 Psi -41.00 +/- 12.00 (-53.00 to -29.00)
assign (resid 9 and name N) (resid 9 and name CA)
(resid 9 and name C) (resid 10 and name N) 1.0 -41.00 12.00 2

! 31. E 10 Psi -39.00 +/- 36.00 (-75.00 to -3.00)
!assign (resid 10 and name N) (resid 10 and name CA)
!(resid 10 and name C) (resid 11 and name N) 1.0 -39.00 36.00 2

! 32. A 11 Psi 142.00 +/- 38.00 (104.00 to 180.00)
assign (resid 11 and name N) (resid 11 and name CA)
(resid 11 and name C) (resid 12 and name N) 1.0 142.00 38.00 2

! 33. P 12 Psi 143.00 +/- 18.00 (125.00 to 161.00)
assign (resid 12 and name N) (resid 12 and name CA)
(resid 12 and name C) (resid 13 and name N) 1.0 143.00 18.00 2

! 34. V 13 Psi -36.00 +/- 22.00 (-58.00 to -14.00)
assign (resid 13 and name N) (resid 13 and name CA)
(resid 13 and name C) (resid 14 and name N) 1.0 -36.00 22.00 2

! 35. E 14 Psi -38.00 +/- 12.00 (-50.00 to -26.00)
assign (resid 14 and name N) (resid 14 and name CA)
(resid 14 and name C) (resid 15 and name N) 1.0 -38.00 12.00 2

! 36. D 15 Psi -30.03 +/- 42.84 (-72.87 to 12.81)
assign (resid 15 and name N) (resid 15 and name CA)
(resid 15 and name C) (resid 16 and name N) 1.0 -30.03 42.84 2

! 37. L 16 Psi -40.58 +/- 11.08 (-51.66 to -29.50)
assign (resid 16 and name N) (resid 16 and name CA)
(resid 16 and name C) (resid 17 and name N) 1.0 -40.58 11.08 2

! 38. I 17 Psi -41.51 +/- 12.02 (-53.53 to -29.49)
assign (resid 17 and name N) (resid 17 and name CA)
(resid 17 and name C) (resid 18 and name N) 1.0 -41.51 12.02 2

! 39. R 18 Psi -38.68 +/- 23.38 (-62.06 to -15.30)
assign (resid 18 and name N) (resid 18 and name CA)
(resid 18 and name C) (resid 19 and name N) 1.0 -38.68 23.38 2

! 40. F 19 Psi -45.74 +/- 13.44 (-59.18 to -32.30)
assign (resid 19 and name N) (resid 19 and name CA)
(resid 19 and name C) (resid 20 and name N) 1.0 -45.74 13.44 2

! 41. Y 20 Psi -37.75 +/- 17.02 (-54.77 to -20.73)
assign (resid 20 and name N) (resid 20 and name CA)
(resid 20 and name C) (resid 21 and name N) 1.0 -37.75 17.02 2

! 42. N 21 Psi -42.94 +/- 9.22 (-52.16 to -33.72)
assign (resid 21 and name N) (resid 21 and name CA)
(resid 21 and name C) (resid 22 and name N) 1.0 -42.94 9.22 2

! 43. D 22 Psi -36.25 +/- 40.28 (-76.53 to 4.03)
assign (resid 22 and name N) (resid 22 and name CA)
(resid 22 and name C) (resid 23 and name N) 1.0 -36.25 40.28 2

```

```

! 44. L 23 Psi -43.70 +/- 14.70 (-58.40 to -29.00)
assign (resid 23 and name N) (resid 23 and name CA)
      (resid 23 and name C) (resid 24 and name N) 1.0 -43.70 14.70 2

! 45. Q 24 Psi -41.02 +/- 7.62 (-48.64 to -33.40)
assign (resid 24 and name N) (resid 24 and name CA)
      (resid 24 and name C) (resid 25 and name N) 1.0 -41.02 7.62 2

! 46. Q 25 Psi -41.96 +/- 16.70 (-58.66 to -25.26)
assign (resid 25 and name N) (resid 25 and name CA)
      (resid 25 and name C) (resid 26 and name N) 1.0 -41.96 16.70 2

! 47. Y 26 Psi -46.57 +/- 13.94 (-60.51 to -32.63)
assign (resid 26 and name N) (resid 26 and name CA)
      (resid 26 and name C) (resid 27 and name N) 1.0 -46.57 13.94 2

! 48. L 27 Psi -39.33 +/- 11.36 (-50.69 to -27.97)
assign (resid 27 and name N) (resid 27 and name CA)
      (resid 27 and name C) (resid 28 and name N) 1.0 -39.33 11.36 2

! 49. N 28 Psi -39.00 +/- 22.00 (-61.00 to -17.00)
assign (resid 28 and name N) (resid 28 and name CA)
      (resid 28 and name C) (resid 29 and name N) 1.0 -39.00 22.00 2

! 50. V 29 Psi -45.00 +/- 14.00 (-59.00 to -31.00)
assign (resid 29 and name N) (resid 29 and name CA)
      (resid 29 and name C) (resid 30 and name N) 1.0 -45.00 14.00 2

```

## 2. Vorläufige chemische Verschiebungen von P11

1 . 1 VAL H H 1 8.07 @ . 9 . .	27 .19 TYR HA H 1 4.362 @ . 9 . .
2 . 1 VAL HA H 1 3.897 @ . 9 . .	28 .19 TYR HB2 H 1 2.847 @ . 9 . .
3 . 1 VAL HB H 1 1.84 @ . 9 . .	29 .19 TYR HB3 H 1 2.65 @ . 9 . .
4 . 1 VAL MG1 H 1 0.74 @ . 9 . .	30 .19 TYR HD1 H 1 6.865 @ . 9 . .
5 . 4 TYR H H 1 8.281 @ . 9 . .	31 .19 TYR HD2 H 1 6.865 @ . 9 . .
6 . 4 TYR HA H 1 4.448 @ . 9 . .	32 .19 TYR HE1 H 1 6.594 @ . 9 . .
7 . 4 TYR HB2 H 1 2.652 @ . 9 . .	33 .19 TYR HE2 H 1 6.594 @ . 9 . .
8 . 4 TYR HB3 H 1 2.506 @ . 9 . .	34 .20 ASN H H 1 8.28 @ . 9 . .
9 . 4 TYR HD1 H 1 7.443 @ . 9 . .	35 .20 ASN HA H 1 4.448 @ . 9 . .
10 . 4 TYR HD2 H 1 7.443 @ . 9 . .	36 .20 ASN HB2 H 1 2.652 @ . 9 . .
11 . 4 TYR HE1 H 1 6.779 @ . 9 . .	37 .20 ASN HB3 H 1 2.506 @ . 9 . .
12 . 4 TYR HE2 H 1 6.779 @ . 9 . .	38 .20 ASN HD21 H 1 7.443 @ . 9 . .
13 .13 PRO HA H 1 3.81 @ . 9 . .	39 .20 ASN HD22 H 1 6.779 @ . 9 . .
14 .13 PRO HB2 H 1 1.51 @ . 9 . .	40 .21 GLN H H 1 8.217 @ . 9 . .
15 .13 PRO HB3 H 1 1.51 @ . 9 . .	41 .21 GLN HA H 1 4.029 @ . 9 . .
16 .13 PRO HG2 H 1 1.74 @ . 9 . .	42 .21 GLN HB2 H 1 1.942 @ . 9 . .
17 .13 PRO HG3 H 1 1.74 @ . 9 . .	43 .21 GLN HB3 H 1 1.815 @ . 9 . .
18 .13 PRO HD2 H 1 3.06 @ . 9 . .	44 .21 GLN HG2 H 1 2.167 @ . 9 . .
19 .13 PRO HD3 H 1 3.06 @ . 9 . .	45 .21 GLN HG3 H 1 2.167 @ . 9 . .
20 .15 GLU H H 1 7.94 @ . 9 . .	46 .22 ALA H H 1 8.186 @ . 9 . .
21 .15 GLU HA H 1 2.93 @ . 9 . .	47 .22 ALA HA H 1 4.158 @ . 9 . .
22 .15 GLU HB2 H 1 1.214 @ . 9 . .	48 .22 ALA MB H 1 1.247 @ . 9 . .
23 .15 GLU HB3 H 1 0.893 @ . 9 . .	49 .23 THR H H 1 7.813 @ . 9 . .
24 .15 GLU HG2 H 1 2.023 @ . 9 . .	50 .23 THR HA H 1 4.106 @ . 9 . .
25 .15 GLU HG3 H 1 2.023 @ . 9 . .	51 .23 THR HB H 1 4.054 @ . 9 . .
26 .19 TYR H H 1 8.07 @ . 9 . .	52 .23 THR MG H 1 1.01 @ . 9 . .



53	.24	GLN	H	H 1	8.13	@ .	9 .	61	.25	THR	MG	H 1	0.921	@ .	9 . .
54	.24	GLN	HA	H 1	4.13	@ .	9 .	62	.26	PHE	H	H 1	8.11	@ .	9 . .
55	.24	GLN	HB2	H 1	1.86	@ .	9 .	63	.26	PHE	HA	H 1	4.46	@ .	9 . .
56	.24	GLN	HB3	H 1	1.78	@ .	9 .	64	.xx	ALA	H	H 1	8.195	@ .	9 . .
57	.24	GLN	HG2	H 1	2.1	@ .	9 .	65	.xx	ALA	HA	H 1	4.163	@ .	9 . .
58	.24	GLN	HG3	H 1	2.1	@ .	9 .	66	.xx	ALA	MB	H 1	1.234	@ .	9 . .
59	.25	THR	HA	H 1	4.087	@ .	9 .								
60	.25	THR	HB	H 1	3.921	@ .	9 .								

### 3. XPLOR-Protokolle

**generate\_prop.inp**

```

remarks  file  nmr/generate.inp
remarks  Generate structure file for a protein
remarks  using the SA parameter and topology files.

topology
    @TOPPAR:topallhdg_prop.pro

end

end                                     {*Read topology file          *}
parameter
    @TOPPAR:parallhdg_prop.pro
end

segment
    name="pgol"
    chain                                     {*Generate protein          *}
    @TOPPAR:toph19.pep
    sequence
    PRO PHE PRO PRO THR PRO PRO GLY GLU GLU
    ALA PRO VAL GLU ASP LEU ILE ARG PHE TYR
    ASN ASP LEU GLN GLN TYR LEU ASN VAL VAL
    end                                     {*obtain the sequence          *}
    end
end

write structure output=pgol.psf end
stop

```

**generate\_template\_prop.inp**

```

remarks    file generate_template.inp
remarks    Generates a "template" coordinate set.  This produces
remarks    an arbitrary extended conformation with ideal geometry.
remarks    Author: Axel T. Brunger

{====>}
structure @pgol.psf end                                {*Read structure file.*}

parameter
{====>}
    @TOPPAR:parallhdg_prop.pro                        {*Read parameters.*}
end

vector idnt (x) ( all )
vector do (x=x/10.) ( all )
vector do (y=random(0.5) ) ( all )
vector do (z=random(0.5) ) ( all )

vector do (fbeta=50) (all)                            {*Friction coefficient, in 1/ps.*}
vector do (mass=100) (all)                            {*Heavy masses, in amu.*}

```

```

parameter
  nbonds
    cutnb=5.5 rcon=20. nbxmod=-2 repel=0.9 wmin=0.1 tolerance=1.
    rexp=2 irexp=2 inhibit=0.25
  end
end

flags exclude * include bond angle vdw end

minimize powell nstep=50 nprint=10 end

flags include impr end

minimize powell nstep=50 nprint=10 end

dynamics verlet
  nstep=50 timestep=0.001 iasvel=maxwell firsttemp= 300.
  tcoupling = true tbath = 300. nprint=50 iprfreq=0
end

parameter
  nbonds
    rcon=2. nbxmod=-3 repel=0.75
  end
end

minimize powell nstep=100 nprint=25 end

dynamics verlet
  nstep=500 timestep=0.005 iasvel=maxwell firsttemp= 300.
  tcoupling = true tbath = 300. nprint=100 iprfreq=0
end

flags exclude vdw elec end
vector do (mass=1.) ( name h* )
hbuild selection=( name h* ) phistep=360 end
flags include vdw elec end

minimize powell nstep=200 nprint=50 end

                                {*Write coordinates.*}
remarks produced by /generate_template.inp
write coordinates output=pgol.pdb end

stop

```

## sa\_pgol.inp

```

remarks file sa.inp
remarks Simulated annealing protocol for NMR structure determination.
remarks The starting structure for this protocol can be any structure with
remarks a reasonable geometry, such as randomly assigned torsion angles or
remarks extended strands.
remarks Author: Michael Nilges

{====>}
evaluate ($init_t = 1000 )          {*Initial simulated annealing temperature.*}
{====>}
evaluate ($high_steps= 6000 )       {*Total number of steps at high temp.*}
{====>}
evaluate ($cool_steps = 3000 )      {*Total number of steps during cooling.*}

parameter                          {*Read the parameter file.*}
{====>}
  @TOPPAR:parallhdg_prop.pro
end

{====>}
structure @pgol.psf
end                                {*Read the structure file.*}

topology
@TOPPAR:topallhdg_prop.pro
end

```

```

{====>}
coordinates @pgol.pdb  {*Read the coordinates.*}

noe
{====>}
    nres=3000                {*Estimate greater than the actual number of NOEs.*}
    class all

{====>}
    @pgol_total.tbl
end

restraints
    dihedral
    reset
    @dihed_talos.tbl
end

flags exclude * include bonds angle impr vdw noe cdih end

                                {*Friction coefficient for MD heatbath, in 1/ps. *}
vector do (fbeta=10) (all)
                                {*Uniform heavy masses to speed molecular dynamics.*}
vector do (mass=100) (all)

noe                                {*Parameters for NOE effective energy term.*}
    ceiling=1000
    averaging * cent
    potential * soft
    scale * 50.
    sqoffset * 0.0
    sqconstant * 1.0
    sqexponent * 2
    soexponent * 1
    asymptote * 0.1                {*Initial value--modified later.*}
    rswitch * 0.5
end

parameter                                {*Parameters for the repulsive energy term.*}
    nbonds
    repel=1.                {*Initial value for repel--modified later.*}
    rexp=2 irexp=2 rcon=1.
    nbxmod=3
    wmin=0.01
    cutnb=4.5 ctonnb=2.99 ctofnb=3.
    tolerance=0.5
end

restraints dihedral
    scale=5.
end

{====>}
evaluate ($end_count=200)                {*Loop through a family of 200 structures.*}

coor copy end

evaluate ($count = 0)
while ($count < $end_count ) loop main

    evaluate ($count=$count+1)

    coor swap end
    coor copy end

    { * ===== Initial minimization.*}
    restraints dihedral scale=5. end
    noe asymptote * 0.1 end
    parameter nbonds repel=1. end end
    constraints interaction
        (not name SG) (all) weights * 1 vdw 0.002 end end
    minimize powell nstep=50 drop=10. nprint=25 end

```

```

    { * ===== High-temperature dynamics.* }
constraints interaction (not name SG) (all)
    weights * 1  angl 0.4  impr 0.1  vdw 0.002  end end

evaluate ($nstep1=int($high_steps * 2. / 3. ) )
evaluate ($nstep2=int($high_steps * 1. / 3. ) )

dynamics verlet
    nstep=$nstep1  timestep=0.002  iasvel=maxwell  firstt=$init_t
    tcoupling=true  tbath=$init_t  nprint=50  iprfrq=0
end

    { * ===== Tilt the asymptote and increase weights on geometry.* }
noe asymptote * 1.0  end

constraints interaction
    (not name SG) (all) weights * 1  vdw 0.002  end end
dynamics verlet
    nstep=$nstep2  timestep=0.002  iasvel=current  tcoupling=true
    tbath=$init_t  nprint=50  iprfrq=0
end

    { * ===== Cool the system.* }

restraints dihedral  scale=200.  end

evaluate ($final_t = 100)      { K }
evaluate ($tempstep = 50)      { K }

evaluate ($ncycle = ($init_t-$final_t)/$tempstep)
evaluate ($nstep = int($cool_steps/$ncycle))

evaluate ($ini_rad = 0.9)      evaluate ($fin_rad = 0.75)
evaluate ($ini_con= 0.003)     evaluate ($fin_con= 4.0)

evaluate ($bath = $init_t)
evaluate ($k_vdw = $ini_con)
evaluate ($k_vdwfact = ($fin_con/$ini_con)^(1/$ncycle))
evaluate ($radius= $ini_rad)
evaluate ($radfact = ($fin_rad/$ini_rad)^(1/$ncycle))

evaluate ($i_cool = 0)
while ($i_cool < $ncycle) loop cool
    evaluate ($i_cool=$i_cool+1)

    evaluate ($bath = $bath - $tempstep)
    evaluate ($k_vdw=min($fin_con,$k_vdw*$k_vdwfact))
    evaluate ($radius=max($fin_rad,$radius*$radfact))

    parameter nbonds repel=$radius  end end
    constraints interaction (not name SG) (all)
        weights * 1. vdw $k_vdw end end

    dynamics verlet
        nstep=$nstep time=0.002 iasvel=current firstt=$bath
        tcoup=true tbath=$bath nprint=$nstep iprfrq=0
    end

{====>}                                { *Abort condition.* }
    evaluate ($critical=$temp/$bath)
    if ($critical > 10. ) then
        display ****&&& rerun job with smaller timestep (i.e., 0.003)
        stop
    end if

end loop cool

    { * ===== Final minimization.* }

constraints interaction (all) (all) weights * 1. vdw 4. end end
minimize powell nstep=200 drop=10.0 nprint=25 end

```

```

{* ===== Write out the final structure(s).*}
print threshold=0.2 noe
evaluate ($rms_noe=$result)
evaluate ($violations_noe=$violations)
print threshold=5. cdih
evaluate ($rms_cdih=$result)
evaluate ($violations_cdih=$violations)
print thres=0.05 bonds
evaluate ($rms_bonds=$result)
print thres=5. angles
evaluate ($rms_angles=$result)
print thres=5. impropers
evaluate ($rms_impropers=$result)
remarks =====
remarks          overall,bonds,angles,improper,vdw,noe,cdih
remarks energies: $ener, $bond, $angl, $impr, $vdw, $noe, $cdih
remarks =====
remarks          bonds,angles,impropers,noe,cdih
remarks rms-d: $rms_bonds,$rms_angles,$rms_impropers,$rms_noe,$rms_cdih
remarks =====
remarks          noe, cdih
remarks violations.: $violations_noe, $violations_cdih
remarks =====

{====>}          {*Name(s) of the family of final structures.*}
evaluate ($filename="SA_"+encode($count)+".pdb")

write coordinates output =$filename end
remarks output file for violations only
evaluate ($outfile="data.out")
set display=$outfile end
display structure= $filename
display energies: $ener, $bond, $angl, $impr, $vdw, $noe, $cdih
display rms-d: $rms_bonds, $rms_angles, $rms_impropers, $rms_noe, $rms_cdih
display violations: $violations_noe, $violations_cdih
set print=$outfile end
display *****
print threshold=0.2 noe
display *****
print threshold=5. cdih
display *****
print thres=0.05 bonds
display *****
print thres=5. angles
display *****
print thres=5. impropers
display *****
*****
set print=schrott end

end loop main

stop

```

### ref\_rama.inp (Änderungen zu ref.inp sind grau hervorgehoben)

```

remarks file based on refine.inp -- Simulated annealing refinement
remarks          for NMR structure determination
remarks  Authors: Michael Nilges, John Kuszewski, and Axel T. Brunger

! Please cite the following paper when using this protocol:
! 1. Nilges, M., Kuszewski, J., and Brunger, A.T. (1991).
!   In: Computational Aspects of the Study of Biological
!   Macromolecules by NMR, (J.C. Hoch, ed.). New York: Plenum Press.
!
{====>}
evaluate ($init_t = 1000)          {*Initial annealing temperature, in K.*}
{====>}
evaluate ($cool_steps = 4000 )    {*Total number of steps during cooling.*}

parameter          {*Read the parameter file.*}
{====>}
@TOPPAR:parallhdg_prop.pro
end

```

```

{====>} structure @pgol.psf end                                { *The structure file.*}

topology
@TOPPAR:topallhdg_prop.pro
end

noe
{====>}
    nres=3000                                { *Estimate greater than the actual number of NOEs.*}
    class all
{====>}
    @pgol_total.tbl
end

{====>}
restraints
    dihedral
    reset
        @dihed_talos.tbl
end

!set values of force constants aus DATABASES/torsions_gaussians/rama.inp

    evaluate ($krama = 1.0)      !intraresidue protein
    evaluate ($kramalr = 0.15) !long range protein
    evaluate ($kvirt1doverall=0.0001) !virtual ca-ca
    evaluate ($kvirt1d=0.001)
    evaluate ($kvirt2d=0.001)
    evaluate ($kvirt3d=0.001)

rama
nres = 10000
    @DATABASES/torsions_gaussians/shortrange_gaussians.tbl
    @DATABASES/torsions_gaussians/new_shortrange_force.tbl
    @DATABASES/torsions_gaussians/longrange_gaussians.tbl
    @DATABASES/torsions_gaussians/longrange_4D_hstgp_force.tbl
end

    @DATABASES/torsions_gaussians/newshortrange_setup.tbl
    @DATABASES/torsions_gaussians/setup_4D_hstgp.tbl

                                { *Friction coefficient for MD heatbath, in 1/ps.*}
vector do (fbeta=10) (all)
vector do (mass=100) (all)      { *Heavy masses to speed molecular dynamics.*}

noe                                { *Parameters for NOE effective energy term.*}
    ceiling=1000
    averaging * cent
    potential * square
    sqconstant * 1.
    sqexponent * 2
    scale * 50.                  { *Constant NOE scale throughout the protocol.*}
end

parameter                        { *Parameters for the repulsive energy term.*}
    nbonds
        repel=0.5                { *Initial value for repel--modified later.*}
        rexp=2 irexp=2 rcon=1.
        nbxmod=3
        wmin=0.01
        cutnb=4.5 ctonnb=2.99 ctofnb=3.
        tolerance=0.5
    end
end

restraints dihedral
    scale=200.
end

{====>}
evaluate ($end_count=200)        { *Loop through a family of 200 structures.*}

```

```

evaluate ($count = 0)
while ($count < $end_count ) loop main

    evaluate ($count=$count+1)

{====>}                                {*Filename(s) for embedded coordinates.*}
    evaluate ($filename="ref_"+encode($count)+".pdb")

    coor @@$filename

    flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih rama end

    vector do (vx=maxwell($init_t)) ( all )
    vector do (vy=maxwell($init_t)) ( all )
    vector do (vz=maxwell($init_t)) ( all )

    evaluate ($final_t = 100)           { K }
    evaluate ($tempstep = 50)           { K }

    evaluate ($ncycle = ($init_t-$final_t)/$tempstep)
    evaluate ($nstep = int($cool_steps/$ncycle))

    evaluate ($ini_rad = 0.9)             evaluate ($fin_rad = 0.75)
    evaluate ($ini_con= 0.003)            evaluate ($fin_con= 4.0)

    evaluate ($bath = $init_t)
    evaluate ($k_vdw = $ini_con)
    evaluate ($k_vdwfact = ($fin_con/$ini_con)^(1/$ncycle))
    evaluate ($radius= $ini_rad)
    evaluate ($radfact = ($fin_rad/$ini_rad)^(1/$ncycle))

    evaluate ($i_cool = 0)
    while ($i_cool < $ncycle) loop cool
        evaluate ($i_cool=$i_cool+1)

        evaluate ($bath = $bath - $tempstep)
        evaluate ($k_vdw=min($fin_con,$k_vdw*$k_vdwfact))
        evaluate ($radius=max($fin_rad,$radius*$radfact))

        parameter nbonds repel=$radius end end
        constraints interaction (all) (all) weights * 1. vdw $k_vdw end end

        dynamics verlet
            nstep=$nstep time=0.002 iasvel=current firstt=$bath
            tcoup=true tbath=$bath nprint=$nstep iprfrq=0
        end

    end loop cool

{====>}                                {*Abort condition.*}
    evaluate ($critical=$temp/$bath)
    if ($critical > 10.) then
        display ***&&& rerun job with smaller timestep (i.e., 0.003)
        stop
    end if
end loop cool

flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih rama end
{* ===== Final minimization.*}
minimize powell nstep= 200 nprint=25 end

{* ===== Write out the final structure(s).*}
print threshold=0.2 noe
evaluate ($rms_noe=$result)
evaluate ($violations_noe=$violations)
print threshold=5. cdih
evaluate ($rms_cdih=$result)
evaluate ($violations_cdih=$violations)
print thres=0.05 bonds
evaluate ($rms_bonds=$result)
print thres=5. angles
evaluate ($rms_angles=$result)
print thres=5. impropers
evaluate ($rms_impropers=$result)
remarks =====
remarks          overall,bonds,angles,improper,vdw,noe,cdih,rama
remarks energies: $ener, $bond, $angl, $impr, $vdw, $noe, $cdih, $rama
remarks =====

```

```

remarks          bonds,angles,impropers,noe,cdih
remarks rms-d: $rms_bonds,$rms_angles,$rms_impropers,$rms_noe,$rms_cdih
remarks =====
remarks          noe, cdih
remarks violations.: $violations_noe, $violations_cdih
remarks =====

{====>}          {*Name(s) of the family of final structures.*}
evaluate ($filename="ref_"+encode($count)+".pdb")

write coordinates output =$filename end

remarks output file for violations only
evaluate ($outfile="dataram.out")
set display=$outfile end
display structure= $filename
display energies: $ener, $bond, $angl, $impr, $vdw, $noe, $cdih, $rama
display rms-d: $rms_bonds, $rms_angles, $rms_impropers, $rms_noe, $rms_cdih
display violations: $violations_noe, $violations_cdih
set print=$outfile end
display *****
print threshold=0.2 noe
display *****
print threshold=5. cdih
display *****
print thres=0.05 bonds
display *****
print thres=5. angles
display *****
print thres=5. impropers
display
*****
set print=schrottram end

end loop main
stop

```

### average.inp

```

remarks file nmr/average.inp
remarks Computes the average structure, atomic rms differences from the
remarks mean for a family of structures, and average overall rms
remarks difference between the family and the mean structure.

{====>}
structure @~/pgol.psf
end          {*Read the structure file.*}

{====>}          {"Backbone" selection--this example is typical for proteins.*}
vector idend ( store9 ) (( name ca or name n or name c ) and (residue 1:30))

        {*===== The first stage consists of computing the mean structure.*}

{====>}          {*Loop through the family of 8 accepted structures.*}
evaluate ($end_count=12)

eval ($nfile=0)
vector do (store1=0) (all)
vector do (store2=0) (all)
vector do (store3=0) (all)
vector do (store4=0) (all)

evaluate ($count = 0)
while ($count < $end_count ) loop main
    evaluate ($count=$count+1)

{====>} {*This is the name of the family of structures.*}
evaluate ($filename=~"/average_"+encode($count)+".pdb")
coor @@$filename

if ($count=1) then
    coor copy end          {*Store first structure in comparison set.*}
end if

```



```

        coor sele=( recall9 ) fit end
        vector do (store1=store1+x) (all)
        vector do (store2=store2+y) (all)
        vector do (store3=store3+z) (all)
        vector do (store4=store4+x*x+y*y+z*z) (all)
        eval ($nfile=$nfile+1)
    end loop main

    vector do (x = store1 / $nfile) (all)
    vector do (y = store2 / $nfile) (all)
    vector do (z = store3 / $nfile) (all)
    vector do (bcomp=sqrt(max(0,store4/$nfile-(x**2+y**2+z**2)))) (all)

        { *The second stage consists of computing an overall rms difference.* }

    evaluate ($save_rmsd_all=0.)
    evaluate ($save_rmsd_back=0.)

    coor copy end

    evaluate ($count = 0)
    while ($count < $end_count ) loop main
        evaluate ($count=$count+1)

    {====>}                                { *This is the name of the family of structures.* }
        evaluate ($filename=~ /AVE/auswahl_ "+encode($count)+".pdb")

        coor @@ $filename
        coor fit sele=( recall9 ) end
        coor rms selection=( recall9 ) end
        evaluate ($save_rmsd_back=$save_rmsd_back + $result)
        coor rms selection=( not hydrogen ) end
        evaluate ($save_rmsd_all = $save_rmsd_all + $result)
    end loop main

    evaluate ($save_rmsd_back=$save_rmsd_back / $nfile)
    evaluate ($save_rmsd_all = $save_rmsd_all / $nfile)
    display ave. rms diff. to the mean struct. for non-h atoms= $save_rmsd_all
    display ave. rms diff. to the mean struct. for the backbone= $save_rmsd_back

        { *==== Finally, the average structure and RMSDs are written to a file.* }
    coor swap end
    vector do (b=bcomp) (( name ca or name n or name c ) and (residue 13:30))

    remarks unminimized average over $nfile files
    remarks ave. rms diff. to the mean struct. for non-h atoms= $save_rmsd_all
    remarks ave. rms diff. to the mean struct. for the backbone= $save_rmsd_back
    remarks b array (last column) is the rms difference from the mean

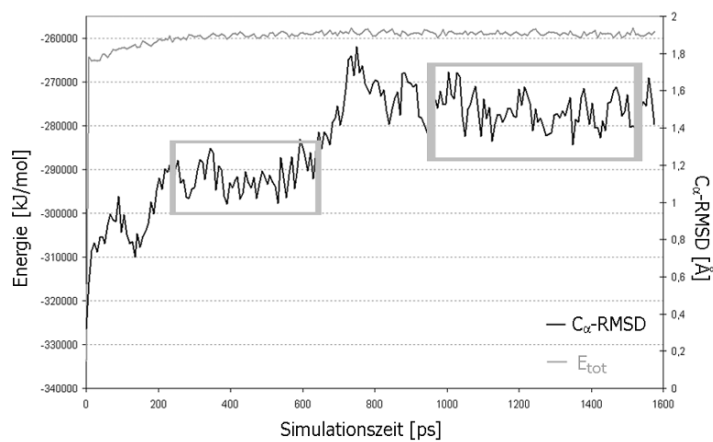
    {====>}                                { *Write average coordinates and RMSDs to specified file.* }
    write coordinates output=~ /AVE/average.pdb end
    stop

```

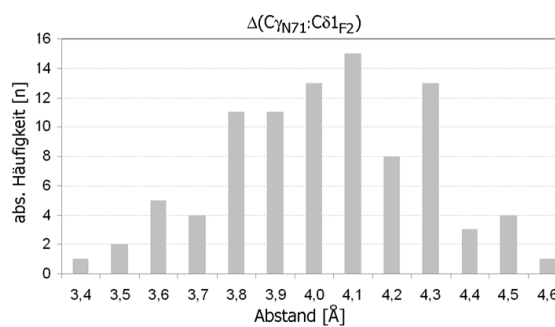
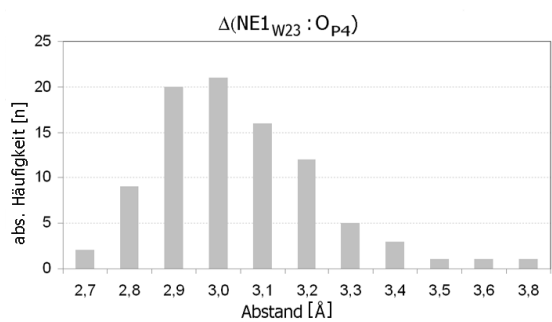
## 4. C $\alpha$ -Traces und Distanzplots der einzelnen Modelle

Als Indikator für den Gleichgewichtszustand der Simulation wurden die Energie und die C $\alpha$ -RMSD-Werte zur Ursprungsstruktur im Laufe der Simulation herangezogen; aufgetragen sind jeweils die berechnete Gesamtenergie und der RMSD-Wert in Ångström. Die weiter analysierten Simulationsschritte sind mit einem Kasten markiert. Zur Validierung der Modelle wurde die Verteilung der Abstände zwischen Resten, welche in der Komplexstruktur von Mena EVH1-Domäne (1evh) charakteristisch für die Bindung sind, innerhalb des gewählten Simulationsintervalls verwendet (s. jeweilige Graphen).

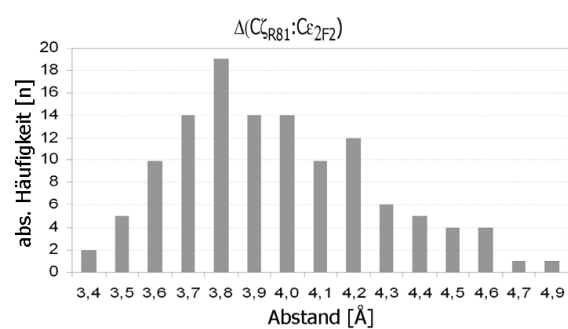
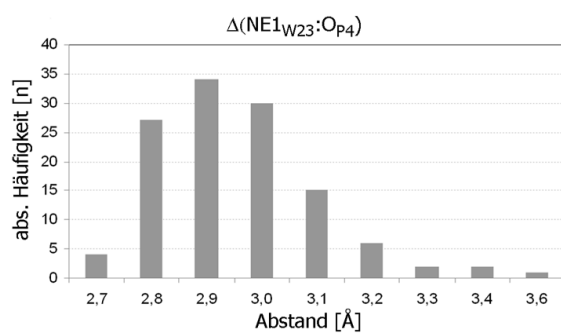
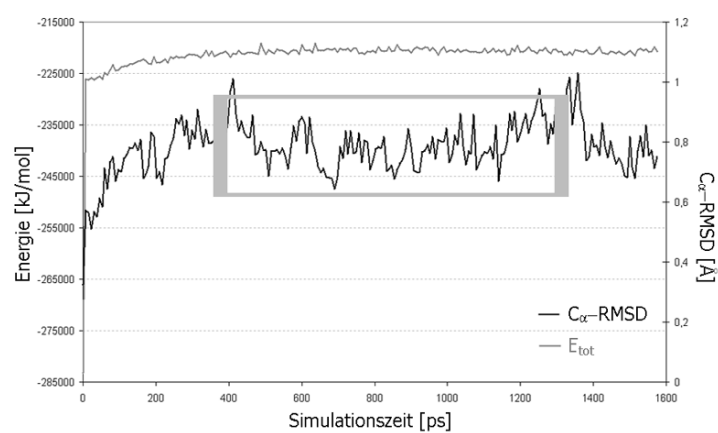
## 4.1 EVH1:pGolemi



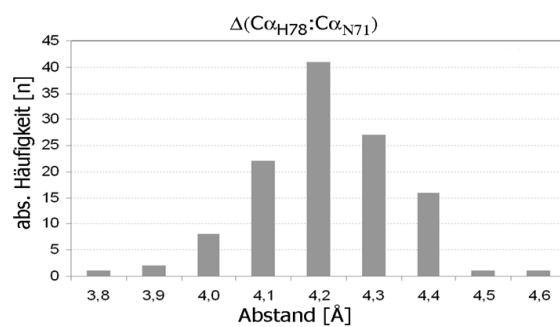
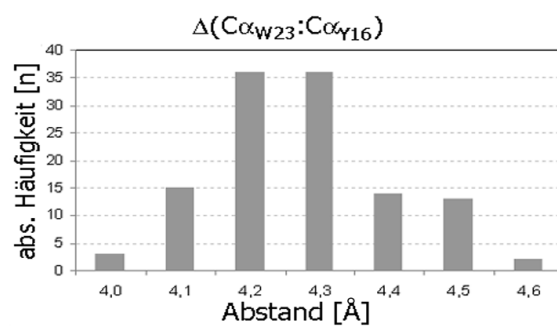
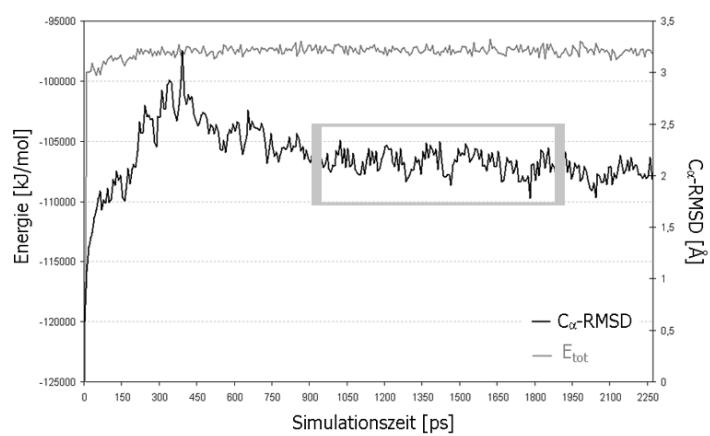
Nach Prüfung der Verteilung von charakteristischen Abständen aus beiden Bereichen wurde für die Erstellung des Modells das zweite Plateau (1150-1500 ps) verwendet, da die Abweichungen der Abstände hier kleiner waren. Die folgenden Distanzplots stammen aus diesem Zeitabschnitt.



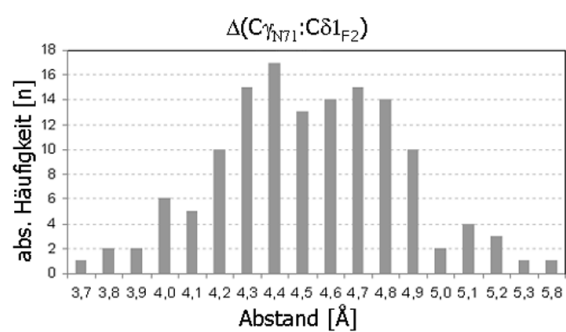
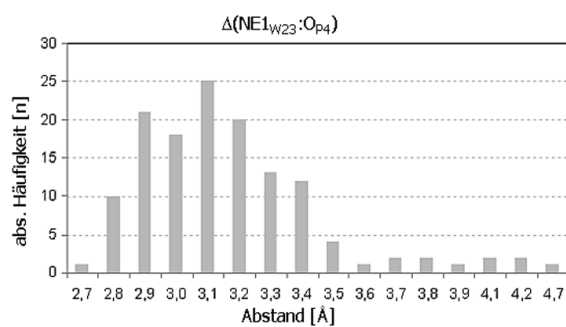
## 4.2 EVH1:PRII



## 4.3 P11



## 4.4 P11:pGolemi



## 5. Kontaktprofil der Homologiemodelle im Vergleich zu experimentellen Daten

Aufgelistet sind jeweils die Reste auf der Mena EVH1-Domäne, welche Kontakt zum Liganden haben. Korrespondierende Aminosäurepositionen befinden sich jeweils auf gleicher Höhe. Die Reste der hydrophoben Triade sind grau hinterlegt.

VASP <sup>1</sup>	Mena <sup>2</sup>	Mena:pGolemi <sup>3</sup>	Mena:PRII <sup>3</sup>	P11:pGolemi <sup>3</sup>
R 10			R 10	
M 14		M 14		M 2
Y 16	Y 16	Y 16	Y 16	Y 4
		K 21		
		K 22		
W 23	W 23	W 23	W 23	W 11
Q 31		T 30	T 30	
A 32			G 31	
F 33			F 32	
			Q 54	
V 67				
V 70				
K 71	K 69	K 69	K 69	
N 73		N 71	N 71	N 20
A 75	A 73	A 73	A 73	
T 76	T 74	T 74	T 74	
			T 76	
F 79	F 77	F 77	F 77	F 26
Q 81	Q 79	Q 79	Q 79	Q 28
	W 80	W 80	W 80	W 29
R 83	R 81	R 81	R 81	R 30
D 84				
V 88	V 86	V 86	V 86	
N 92	N 91		N 90	
G 94				

1: Entnommen aus Ball *et al.*, 2000 basierend auf *chemical shift perturbation*-Messungen bei Zugabe von PRIII zur VASP-Domäne.

2: Werte aus der Kristallstruktur von Mena EVH1:FP4 (PDB-Eintrag 1evh, Prehoda *et al.*, 1999).

3: In der vorliegenden Arbeit erstellte Strukturmodelle (Kap. III.5 und IV.3).

## DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Bayer für die freundliche Bereitstellung des Themas und seine trotz straffer Zeitpläne stets wohlwollende, geduldige und großmütige Erziehung zur wissenschaftlichen Souveränität danken. Prof. Dr. Jutta Eichler danke ich für die zur Verfügung gestellten Peptide.

Meiner Mentorin Prof. Dr. Henrike Heise danke ich für konstruktive Gespräche und neue Einsichten in die NMR-Landschaft.

Dr. Jonathan Wolf Müller gilt mein besonderer Dank für viele Anregungen und Diskussionen nicht nur wissenschaftlicher Art sowie seine lebhaften Bemühungen, mir die Wissenschaft schmackhaft zu machen. Dr. Klaus Vitzithum danke ich für die Erinnerung an ein Leben jenseits der Universität und nützliche Tips für die aufkommenden Schwierigkeiten des Doktorandenalltags.

Herzlich möchte ich mich bei Anna Foik, Dr. Eva Krammer und Dr. Nadezhda Kovalevskaya für offene Ohren, moralische Unterstützung, viel Geduld und die stete Bereitschaft zum Austausch wissenschaftlicher Trivia bedanken.

Der gesamten Arbeitsgruppe Biochemie und deren ehemaligen Mitgliedern danke ich für die freundliche, lockere und entspannte Arbeitsatmosphäre.

Dem exquisiten Bouquet von Menschen, die ich meine Freunde nennen darf, bin ich für Ihre Geduld, Ihren Beistand und Ihr Verständnis für mein ehrgeiziges Projekt zu tiefem Dank verpflichtet.

Für die Unterstützung während meiner gesamten Universitätszeit, vor Allem aber während des letzten Abschnitts, danke ich meiner Familie. Obwohl ich die zeitlichen und persönlichen Anforderungen der Promotion meist nicht vor der Tür lassen konnte, durfte ich mir Ihres Verständnisses immer sicher sein. Ohne diesen festen Rückhalt stünde ich sicher nicht dort, wo ich jetzt stehe.

**Danke.**

---